

Sascha Adler

„Identifizierung von Kollagentypen mit Hilfe der Methode des
Peptide Mappings“

DIPLOMARBEIT

an der

HOCHSCHULE MITTWEIDA

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Freiberg, 2010

Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer: Dr. rer. nat. Michael Meyer

Vorgelegte Arbeit wurde verteidigt am: 02. Dezember 2010

Bibliografische Beschreibung:

Adler, Sascha: Identifizierung von Kollagentypen mit Hilfe der Methode des Peptide Mappings. – 2010. – 89 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Diplomarbeit, 2010

Kurzreferat:

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, verschiedene Peptidkarten von Rinderhaut-Kollagen zu erstellen. Diese sollen eine Charakterisierung von Kollagentypen ermöglichen. Im ersten Teil dieser Arbeit wird das Kollagen mit Hilfe von Bromcyan und speziellen Enzymen in definierte Peptide gespalten. Im zweiten Teil der Arbeit soll überprüft werden, inwiefern die einzelnen Hydrolysefragmente mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Zum Schluss erfolgt eine Bewertung der Praxistauglichkeit dieser Methoden zur Bestimmung von unterschiedlichen Kollagentypen.

Abstract:

The aim of this work is to develop peptide maps of bovine skin collagen in order to allow the characterization of different collagen types, particularly type I and III collagen. In the first part of this work, collagen is cleaved into defined peptides by using cyanogen bromide or special enzymes. In the second part, the individual fragments obtained from chemical or enzymatical cleavage will be separated by using two-dimensional gel electrophoresis. This electrophoretic method will be studied to evaluate its suitability for the determination of different collagen types.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wünschiers von der Hochschule Mittweida für die freundliche Betreuung und Unterstützung der Diplomarbeit.

In gleicher Weise danke ich Herrn Dr. Michael Meyer, Leiter des Fachbereiches Leder/Biopolymere im Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen in Freiberg, für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu können und seine stets fachliche und freundliche Betreuung.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dipl. -Lebensmittelchemikerin Ines Stachel für die kompetente Betreuung der Arbeit im Forschungsinstitut. Frau Stachel stand mir bei organisatorischen, technischen und wissenschaftlichen Fragen zur Seite und unterstützte mich bei der Umsetzung und dem Schreiben dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern im Laboratorium für die stets gute Arbeitsatmosphäre und den vielseitigen Hilfestellungen. Dabei möchte ich mich gesondert bei Frau Caroline Vogler und Frau Sabine Kleinwechter bedanken, welche mir bei vielen Fragestellungen geholfen haben. Frau Marion Georgi danke ich für die Hilfe bei der Bestimmung von enzymatischen Abbaugraden.

Mein weiterer Dank gilt Frau Marit Wolf, Nadine Drechsel, Sandra Gruner und Frau Diana Romstedt für eine entspannte Büroatmosphäre sowie Unterstützungen beim Schreiben dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mich stets in jeglicher Lebenslage unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Gleichungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Die Biochemie des Kollagens.....	2
2.1.1 Die Struktur des Kollagenmoleküls.....	2
2.1.2 Die Biosynthese	4
2.2 Vorkommen und Extraktion von Kollagen	6
2.2.1 Die Kollagenfamilie.....	7
2.2.2 Fibrilläre Kollagene.....	8
2.2.3 Extraktionsmethoden.....	11
2.3 Kollagenfragmente.....	13
2.3.1 Bromcyan-Spaltung.....	13
2.3.2 Enzymatische Spaltung.....	15
2.4 Analyse der Kollagenfragmente	25
2.4.1 Die Elektrophorese.....	25
2.4.2 Das Polyacrylamid-Gel	26
2.4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	28
3 Material und Methoden.....	34
3.1 Materialien	34
3.2 Geräte.....	35
3.3 Methoden.....	36
3.3.1 Bromcyan-Spaltung.....	36
3.3.2 Enzymatische Spaltung.....	37
3.3.3 Bestimmung des Abbaugrades.....	38
3.3.4 Isoelektrische Fokussierung	39
3.3.5 SDS-PAGE	40
3.3.6 Färbeprotokolle	43

4	Ergebnisse und Diskussion	45
4.1	Vergleich Auftragspuffer-Äquilibrationpuffer	45
4.2	Isoelektrische Fokussierung	47
4.3	Kollagen-BrCN-Peptide	51
4.3.1	Auftrennung von Kollagen-BrCN-Peptiden	51
4.3.2	Identifizierung von Kollagentypen	57
4.4	Enzymatisch gespaltene Kollagenfragmente	61
4.4.1	Enzymatische Spaltung	61
4.4.2	Auftrennung der Hydrolysefragmente	66
4.4.3	Enzymatische Spaltung verschiedener Kollagentypen	74
4.4	Densitometrische Auswertung der Peptidkarten	77
5	Zusammenfassung	83
6	Ausblick	85
7	Anhang	86
	Literaturverzeichnis	XIII
	Selbstständigkeitserklärung	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ag ⁺	Silber-Ion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
BrCN	Bromcyan
C	Kohlenstoff
C (%)	Quervernetzer-Konzentration
c	Konzentration
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	BrCN-Peptid (Kurzbezeichnung)
c-DNA	Complementary-deoxyribonucleic acid
Cl ⁻	Chlorid-Ion
COL	Collagenous domain
CRR	Cystein-rich repeat
D	Diffusionskoeffizient
DEAE	Diethylaminoethyl
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Elektrische Feldstärke
e	Elementarladung
E-64	Irreversibler Cystein-Protease-Inhibitor
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACIT	Fibrillar-associated collagens with interrupted triple-helix
F _B	Beschleunigende Kraft
F _R	Reibungskraft
GE	Gelelektrophorese
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HCl	Salzsäure
His	Histidin

Hpx	Hemopexin
Hyp	Hydroxyprolin
I	Elektrische Stromstärke
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ile	Isoleucin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilo Dalton
k_R	Reibungskoeffizient
Leu	Leucin
M	mol/l
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
Mn^{2+}	Mangan-Ion
Multiplexin	<u>Multiple</u> triple helix with <u>int</u> erruptions
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NC	Non-collagenous domain
OH	Hydroxyl
P	Elektrische Leistung
PA	Polyacrylamid
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffaktivität
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
q	Ladung (Analyten)
R	Ohmscher Widerstand
Rf	Relative Laufstrecke
r_i	Hydrodynamischer Radius
rpm	Drehzahl (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ser	Serin
SLK	Säurelösliches Kollagen
T	Temperatur
T (%)	Acrylamidkonzentration
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEMPs	Tissue engineered medical products
TLN	Thermolysin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Elektrische Spannung/ Unit (Enzymaktivität)
u_i	Elektrophoretische Beweglichkeit
v/v	Volumenprozent (volume by volume)
Vh	Voltstunden
v_i	Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten
W	Joule'sche Wärme/ Watt
w/v	Masseprozent (weight by volume)
z_i	Ladungszahl des Ions
Zn^{+}	Zink-Ion
η	Viskosität
λ	Äquivalenzleitfähigkeit
μl	Mikroliter
ΔpI	Auflösungsvermögen der IEF

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Fibrilläre Kollagenstruktur	3
Abbildung 2:	Schema gefundener Wasserstoffbrückenbindungen in der Tripelhelix	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese intra- und extrazellulär	5
Abbildung 4:	Allgemeine Proteindomäne fibrillärer Kollagene	9
Abbildung 5:	Domänen der α_1 - und α_2 -Propolypeptidketten des Typ I	10
Abbildung 6:	Reaktionsschema der BrCN-Spaltung	13
Abbildung 7:	CB von $\alpha_1(I)$, $\alpha_2(I)$ und $\alpha_1(III)$	16
Abbildung 9:	Die Aminosäuresequenz von α -Chymotrypsin	17
Abbildung 10:	Reaktionsmechanismus von α -Chymotrypsin	19
Abbildung 11:	Darstellung der Stufen des Kollagenabbaus (Typ I)	21
Abbildung 12:	Spezifische Kollagenaseaktivität	22
Abbildung 13:	Experimentell unterstützter Reaktionszyklus von TLN	24
Abbildung 14:	Polymerisation von Polyacrylamid	27
Abbildung 15:	Abhängigkeit der Nettoladung eines Proteins vom pH-Wert	29
Abbildung 16:	Aufbau eines IPG-Streifens	30
Abbildung 17:	Apparative Anordnung der SDS-PAGE (2D-GE)	31
Abbildung 18:	SDS-Struktur mit einer polaren und einer unpolaren Gruppe	32
Abbildung 19:	Deckproblem im 2D-Gel	33
Abbildung 20:	Vergleich von Äquilierungspuffer und Auftragspuffer	46
Abbildung 21:	Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 1: 1370 Vh): Fokussierung von Kollagen-BrCN-Peptiden (Kollagenstandard Typ III) mit IPG-Streifen von 6-10	47
Abbildung 22:	Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 2: 6600 Vh): Fokussierung von enzymatisch gespaltenem SLK (TLN, 37°C bei 4 Stunden) mit IPG-Streifen von 3-10	48
Abbildung 23:	Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 2: 6600 Vh): Fokussierung von enzymatisch gespaltenem bovinen Kollagenstandard-Typ I (TLN, 37°C bei 4 Stunden) mit IPG-Streifen von 3-10	49
Abbildung 24:	Kristallisationsspuren eines IPG-Streifens 3-10 nach der Fokussierung mit TLN gespaltenem SLK mit 11000 Vh	50

Abbildung 25:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10NL und 11000 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension	52
Abbildung 26:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10NL und 3500 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension	53
Abbildung 27:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension	55
Abbildung 28:	Darstellung der BrCN-Peptide von Rinder-SLK	56
Abbildung 29:	Eingefärbter IPG-Streifen von 6-10 nach der Fokussierung mit 1370 Vh	56
Abbildung 30:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK (100 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension	57
Abbildung 31:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem bovinen Kollagenstandard Typ III (70 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension.	58
Abbildung 32:	Zuordnung von Spots der in Abb. 30 dargestellten Peptidkarte (BrCN gespaltenes SLK)	59
Abbildung 33:	Peptidkarte von BrCN gespaltenem bovinen Kollagenstandard Typ I (70 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension	60
Abbildung 34:	Prozentualer Abbau von Rinder-SLK durch verschiedene Enzyme bei 37°C	62
Abbildung 35:	Darstellung von Spaltfragmenten (SLK) und verwendeter Enzyme in einem neutralen 8 %igen PAG.....	63
Abbildung 36:	Densitometrische Auswertung der Spuren 2, 5 und 8	65
Abbildung 37:	pI-Werte bekannter Proteine zur Etablierung einer Abszisse für die erste Dimension.....	66

Abbildung 38:	Durch Kollagenase gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (4 µl Auftragsvolumen, Coomassie).....	68
Abbildung 39:	Durch α-Chymotrypsin gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (10 µl Auftragsvolumen, Silberfärbung).....	69
Abbildung 40:	Durch TLN gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (4 µl Auftragsvolumen, Coomassie).....	70
Abbildung 41:	Durch Kollagenase gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (10 µl Auftragsvolumen, Coomassie).....	71
Abbildung 42:	Durch α-Chymotrypsin gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (10 µl Auftragsvolumen, Silberfärbung).....	72
Abbildung 43:	Durch TLN gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (10 µl Auftragsvolumen, Coomassie).....	73
Abbildung 44:	Durch TLN gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (5 µl Auftragsvolumen, Coomassie).....	74
Abbildung 45:	Darstellung eventueller Spaltfragmente aus der Spaltung mit TLN.....	75
Abbildung 46:	Durch TLN gespaltene Fragmente von kommerziellen Typ III-Kollagen.....	76
Abbildung 47:	Aufteilung einer von mit TLN gespaltenem nativem Kollagen erhaltenen Peptidkarte nach Spuren (Gene Tools)..	78
Abbildung 48:	Densitogramme der Spur 7 aus Abb. 46.....	79
Abbildung 49:	Spoterkennung durch Progenesis SameSpots	80
Abbildung 50:	3D-Ansicht einzelner Spots aus Abb. 48 (Progenesis SameSpots)	81
Abbildung 51:	Coomassie gefärbte IPG-Streifen 6-10 nach der Fokussierung mit 1370 Vh von BrCN gespaltenem SLK (Abb. 27)	86
Abbildung 52:	Coomassie gefärbte IPG-Streifen von 3-10 nach der Fokussierung mit 6600 Vh	86
Abbildung 53:	Peptidkarte von Kollagenase gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10 und 6600 Vh sowie mit einem 8-16 %igem PAG in der zweiten Dimension.	87
Abbildung 54:	Peptidkarte einer zweidimensionalen Auftrennung von Kollagenase.	88
Abbildung 55:	Peptidkarte von TLN gespaltenem kommerziellen Kollagentyp I-Standard	89

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1:	Beschleunigende Kraft	25
Gleichung 2:	Reibungskraft	25
Gleichung 3:	Wanderungsgeschwindigkeit	26
Gleichung 4:	Mobilität kugelförmiger Analyten	26
Gleichung 5:	Joule'sche Wärme	26
Gleichung 6:	Berechnung der Totalacrylamidkonzentration und des Vernetzungsgrades	27
Gleichung 7:	SVENSSON-Gleichung	30
Gleichung 8:	Prozentualer Abbaugrad	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Aminosäurezusammensetzung von Kollagen	2
Tabelle 2:	Eigenschaften und Vorkommen wichtiger Bindegewebsarten.....	6
Tabelle 3:	Charakterisierung der Kollagentypen nach Strukturmerkmalen	7
Tabelle 4:	Aufbau und Vorkommen der Typen I, II, III und V	8
Tabelle 5:	Molmassen einiger CB von Typ I-Kollagen	14
Tabelle 6:	Charakterisierung einiger Serin- und Metallo-Proteasen hinsichtlich ihrer Spaltstellen sowie des Bildungsortes und Hemmstoffe.....	16
Tabelle 7:	Übersicht einiger Matrix-Metallo-Proteasen	20
Tabelle 8:	Chemikalienliste	34
Tabelle 9:	Enzyme	35
Tabelle 10:	Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 11:	Trennbereiche der Gele.....	41
Tabelle 12:	Zusammensetzung eines gebräuchlichen Probenpuffers für die 2D-Gelelektrophorese.....	45
Tabelle 13:	Richtlinie zur Fokussierung von IPG <i>BlueStrips</i> (7 cm) der Firma Serva....	51
Tabelle 14:	Peakflächen der Densitogramme.....	65
Tabelle 15:	Ergebnisse der Analyse der Spots mit Gene Tools.....	80
Tabelle 16:	Ergebnisse der Analyse der Spots mit Progenesis SameSpots	81

1 Einleitung

Kollagene bilden eine große Familie extrazellulärer Strukturproteine (Skleroproteine). Der Name stammt aus dem griechischen und bedeutet „Leim erzeugend“. Diese Bedeutung ist auf frühe Anwendungen des Kollagens als Knochenleim zurückzuführen. Als Bestandteil des Bindegewebes kommt es überwiegend in Haut, Knochen und den Gefäßen vor. Mit Ausnahme der Einzeller ist es im gesamten Tierreich zu finden. Dabei macht der Anteil an Kollagen bis zu 30 % an der Gesamtproteinmasse in Wirbeltieren aus [Reich 1966].

Innerhalb der Kollagenfamilie gibt es verschiedene Typen, wodurch spezifische Gewebestrukturen ausgebildet werden. Beispielsweise können Mikrofibrillen, Fibrillen und membranartige Netze entstehen. Dementsprechend variieren die Eigenschaften und die damit verbundenen Anwendungen. Beispielsweise wird das aus Haut und Knochen extrahierte Kollagen, welches überwiegend aus Typ I besteht, zu Leder oder Gelatine verarbeitet. Gelatine selbst ist ein im warmen Wasser lösliches Partialhydrolysat des Kollagens, welches überwiegend vom Rind bzw. Schwein gewonnen wird.

Aufgrund der hohen Zugfestigkeit sowie der guten Biokompatibilität finden Kollagene verstärkt Anwendung in der Medizin. Diesbezüglich werden diese als Gerüst für künstliche Organe eingesetzt oder dienen als Hauttransplantat. Weiterhin zeigen Kollagene gute Effekte auf die Adhäsion, Vermehrung und Differenzierung von Zellen, weshalb kollagene Gewebe als Biomaterial für die Zellkultivierung besonders gut geeignet sind [Shanmugasundaram 2004]. Diese Gewebe müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, damit sie beispielsweise als Substrate für die Gewebezüchtung medizinischer Produkte (TEMPs) eingesetzt werden oder als Anwachsmaterial von Zellen an Implantaten dienen können. Aus diesem Grund ist es notwendig, Kollagentypen in Gewebeproben zu analysieren. Die Analyse verschiedener Kollagentypen kann mit Methoden wie Western Blot, Größenausschluss- und Ionenaustauschchromatografie sowie mit Gelelektrophorese erfolgen [Vogler 2009].

Innerhalb dieser Arbeit soll nun geprüft werden, inwieweit Kollagentypen mit Hilfe der Methode des „Peptide Mappings“ charakterisiert werden können. Dabei wird aus Rinderhaut gewonnenes, lösliches Kollagen chemisch und enzymatisch gespalten. Die entstandenen Fragmente werden anschließend durch die Kombination zweier elektrophoretischer Methoden aufgetrennt, so dass spezifische Peptidkarten entstehen. Diese sollen eine Identifizierung von Kollagentypen ermöglichen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Biochemie des Kollagens

Kollagene sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens weitverbreitete Forschungsobjekte. Derzeit sind 28 verschiedene Typen identifiziert [Kadler et al. 2007; Bächinger et al. 2010]. Aufgrund des hohen Anteils von Kollagen Typ I in Haut, Knochen, Sehnen und Gefäßen wird dieser Typ als Vorbild zur allgemeingültigen Beschreibung der Kollagene verwendet [Fratzl 2008].

Die Primärstruktur der Kollagene ist durch eine sich wiederholende Aminosäuresequenz in Form von Gly-X-Y charakterisiert. Dabei findet sich an Position X häufig die Aminosäure (AS) Prolin (Pro) bzw. an Position Y Hydroxyprolin (Hyp) (Abb. 1 A). Dieses Tripetid hat große Bedeutung für die Ausbildung und Stabilität der Sekundär- und Tertiärstruktur von Kollagenen [Kühn 1967]. Eine einzelne Kollagen-Polypeptidkette besteht aus durchschnittlich 1000 AS (Tab. 1) [Silver 2006].

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von Kollagen [Reich 1966]

Aminosäure	Mol AS pro 1000 Mol AS
Glycin	363,0
Prolin	131,3
Hydroxyprolin	107,0
Hydroxylysin	6,8
Tyrosin	5,5
Tryptophan	-
Saure AS	124,3
Basische Aminosäuren	91,7

2.1.1 Die Struktur des Kollagenmoleküls

Erste Erkenntnisse über die Sekundär- und Tertiär-Struktur von Kollagen lieferten die Modelle von *Rich und Crick* (1961) bzw. *Ramachandran und Sasisekharan* (1961), wonach diese eine tripel-helikale Struktur aufweisen.

Aufgrund des hohen Anteils an Glycin und den Iminosäuren (Pro, Hyp) kommt es zur Ausbildung einer Polyprolin-Helix II (Abb. 1 A). Diese ist im Vergleich zur α -Helix globulärer Proteine gestreckter [Asher et al. 2004]. Das charakteristische Merkmal aller Kollagene besteht darin, dass jeweils drei linksläufige α -Polypeptidketten zu einer rechtsläufigen Superhelix (Tripelhelix) ineinander verdreht sind (Abb. 1 C). Diese Tertiärstruktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abb. 1 B). Je nach Kollagentyp (Kapitel 2.2.2) variiert die genaue gegenseitige Anordnung der Einzelketten und die Zahl der möglichen

Wasserstoffbrücken [Reich 1966]. Am Ende der Tripelhelix treten jeweils kurze, nicht helikale Regionen auf (Telo peptide). Die Zahl und Länge der Telo peptide variiert ebenfalls je nach Kollagentyp [Fratzl 2008]. Bei den fibrillären Kollagenen liegen die einzelnen Tripelhelices um $\frac{1}{4}$ ihrer Länge versetzt in Längsrichtung aneinander (Abb. 1 D). Dadurch entstehen Zwischenräume, welche als helle bzw. dunkle Querstreifen im Rasterelektronenmikroskop zu erkennen sind (Abb. 1 E). Dieses Querstreifenmuster weist eine periodische Distanz auf und ist damit ein charakteristisches Merkmal faserbildender Kollagene [Cowin und Doty 2007].

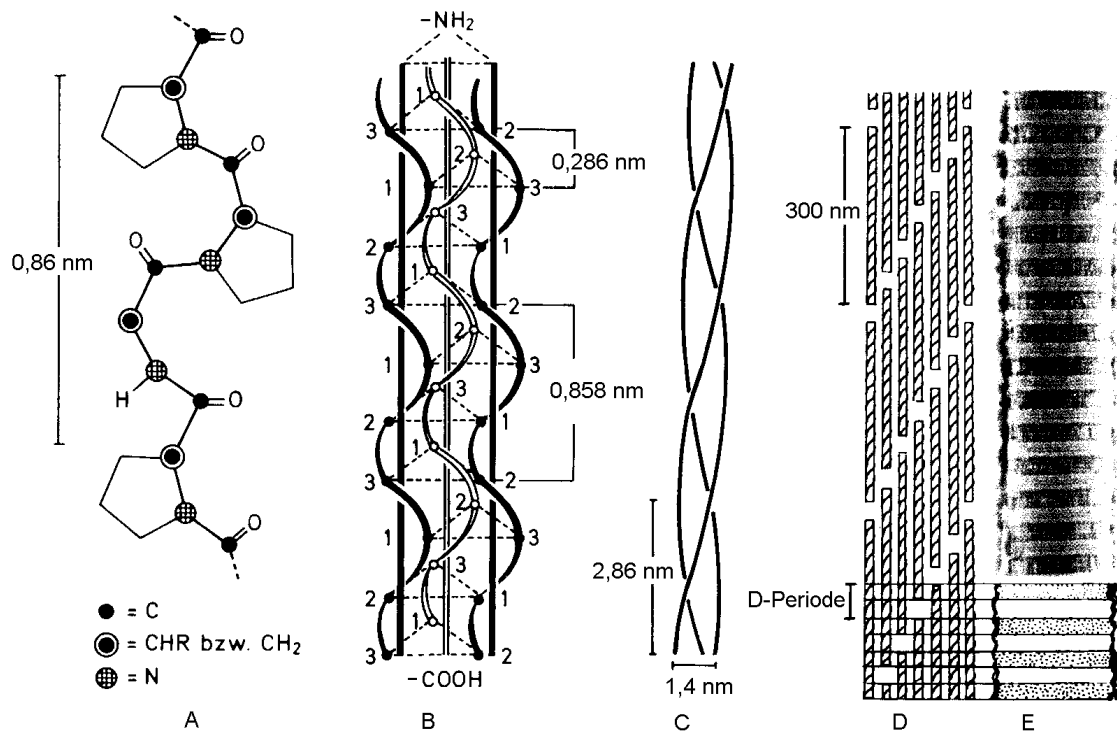


Abbildung 1: Fibrilläre Kollagenstruktur. (A) Peptidkette mit Iminogruppen und Glycin. (B) Vereinfachte Darstellung der drei α-Polypeptidketten, stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen. (C) Tatsächliche, seilartige Verdrillung der α-Polypeptidketten zur Tripelhelix. (D) Tripelhelix um $\frac{1}{4}$ der Länge versetzt in Längsrichtung. (E) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Querstreifen fibrillärer Kollagene [Karlson 1972; Gelse et al. 2003]

Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Kollagen-Polypeptidsträngen bilden sich zum einen direkt (Abb. 2 A) und zum anderen indirekt über Wassermoleküle (H_2O) aus. In Abbildung 2 sind mögliche Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt. Bei direktem Kontakt sind daran im Kollagen die Aminogruppe und die Carbonylgruppe beteiligt. Die Ausbildung der indirekten intermolekularen Anziehungskräfte über Wassermoleküle erfolgt dagegen zwischen zwei Carbonylgruppen (Abb. 2 B) bzw. zwischen einer Carbonylgruppe und einer Hydroxylgruppe von Hydroxyprolin (Abb. 2 C). Hydroxyprolin (4-Hydroxyprolin), als posttranslational modifizierte Form des Prolin besitzt am C_4 eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe (OH-Gruppe) und weist in der Y-Position des Tripeptids Gly-X-Y eine höhere

Stabilität als Prolin selbst auf. Die OH-Gruppe kann selbst keine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden. Vielmehr wirkt sie als Akzeptor bzw. Donator, was zur Folge hat, dass die Wassermoleküle auf zwei unterschiedliche Weise binden können (Abb. 2 C) [Brodsky und Ramshaw 1997]. Daher ist der Gehalt an Hydroxyprolin sowie dessen Position für die hydrothermische Stabilität der Kollagen-Tripelhelix bedeutend [Jimenez et al. 1973].

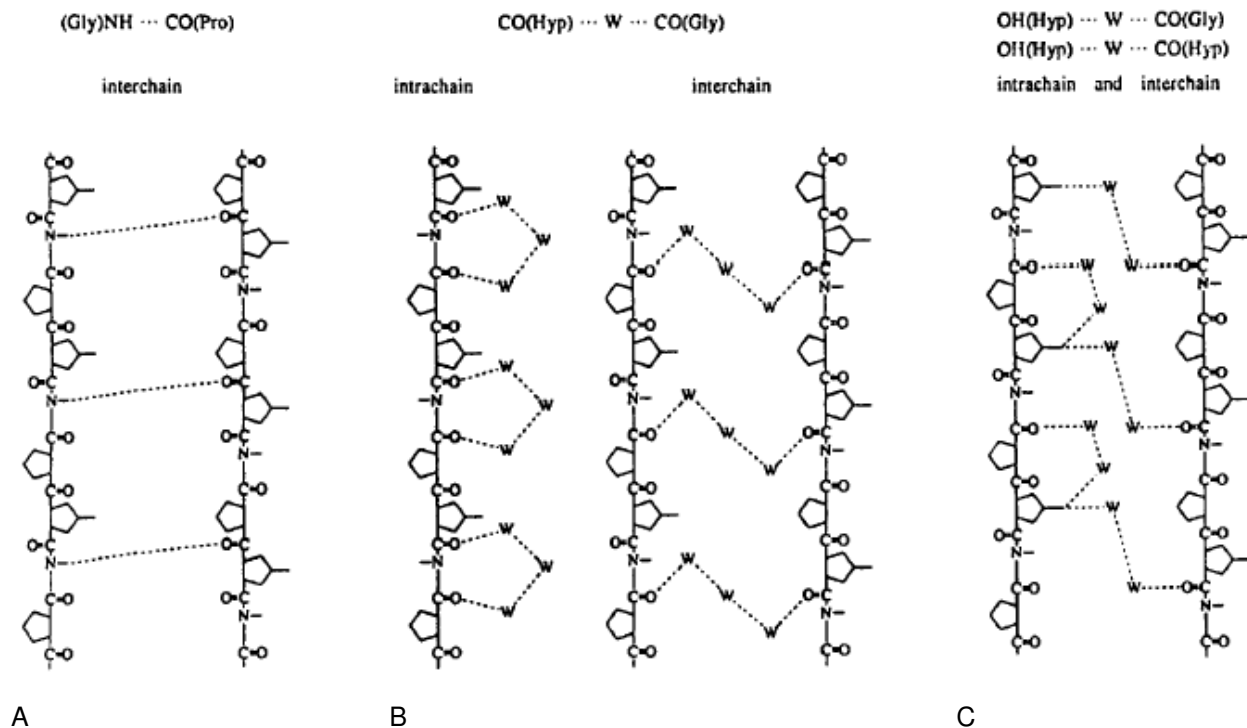


Abbildung 2: Schema gefundener Wasserstoffbrückenbindungen in der Tripelhelix. (A) direkt: Aminogruppe (Glycin) und Carbonylgruppe (Position X). (B) indirekt über Wassermolekül: Carbonylgruppe (Hydroxyprolin) und Carbonylgruppe (Glycin). (C) indirekt über Wassermolekül: Hydroxylgruppe (Hydroxyprolin) und Carbonylgruppe (Glycin) bzw. Hydroxylgruppe (Hydroxyprolin) und Carbonylgruppe (Hydroxyprolin) [Bella et al. 1995]

2.1.2 Die Biosynthese

Die Kollagensynthese gliedert sich in intrazelluläre und extrazelluläre Prozesse (Abb. 3). Die Translation der α -Polypeptidkette findet im endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt. Da diese Kette eine Vorstufe des Kollagens darstellt, wird diese als Pro- α -Kollagenkette bezeichnet. Schon während der Translation finden posttranslationale Modifikationen der α -Ketten statt. Durch die Enzyme Peptidyl-Prolyl-Hydroxylase bzw. Lysin-Hydroxylase werden Prolin und Lysin hydrolysiert, was für die Stabilität innerhalb des Moleküls und in der extrazellulären Matrix von Bedeutung ist. Anschließend wird an die Hydroxylysin-Reste Galaktose bzw. Glykosylgalaktose (Glykosylierung) unter Enzymeinfluss gebunden [van den Berg und Cabri 2003]. Die drei α -Polypeptidketten verdrillen sich zur Tripelhelix und bilden Prokollagenmoleküle. Damit das Prokollagenmolekül in den extrazellulären Raum gelangen

kann, muss es löslich bleiben und es darf sich nicht mit anderen Kollagenmolekülen vernetzen. Dies wird durch Registerpeptide am C- und N-Terminus erreicht. Durch Zellvesikel (Golgi-Apparat) gelangt das Prokollagen zur Zellmembran und wird durch den Vorgang der Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben. Die Registerpeptide werden nun durch N-Prokollagen- bzw. C-Prokollagen-Peptidase abgespalten und es entstehen Tropokollagenmoleküle. Diese bilden durch parallele Aggregationen mit anderen Tropokollagenmolekülen Mikrofibrillen aus [Koide und Nagata 2005]. Die Mikrofibrillen bilden wiederum Fibrillen, welche zu Fasern bzw. Faserbündeln wachsen (hierarchische Struktur). Die Stabilität der Kollagenmoleküle wird vor allem durch kovalente Quervernetzungen (cross-links) im Bereich der Telo peptide gewährleistet. Dabei unterscheidet man zwischen intramolekularen und intermolekularen Quervernetzungen [Bhat 2002]. Cross-links entstehen bereits während der Fibrillenbildung durch den Einfluss von Lysinoxidase. Dieses Enzym setzt Lysin bzw. Hydroxylysin zu den Aldehyden Allysin und Hydroxyallysin um. Die Aldehyde bilden mit anderen Lysinen und Hydroxylysinen stabile Ketoaminverbindungen, welche als Schiff'sche Basen bezeichnet werden [Mayne und Burgeson 1987].

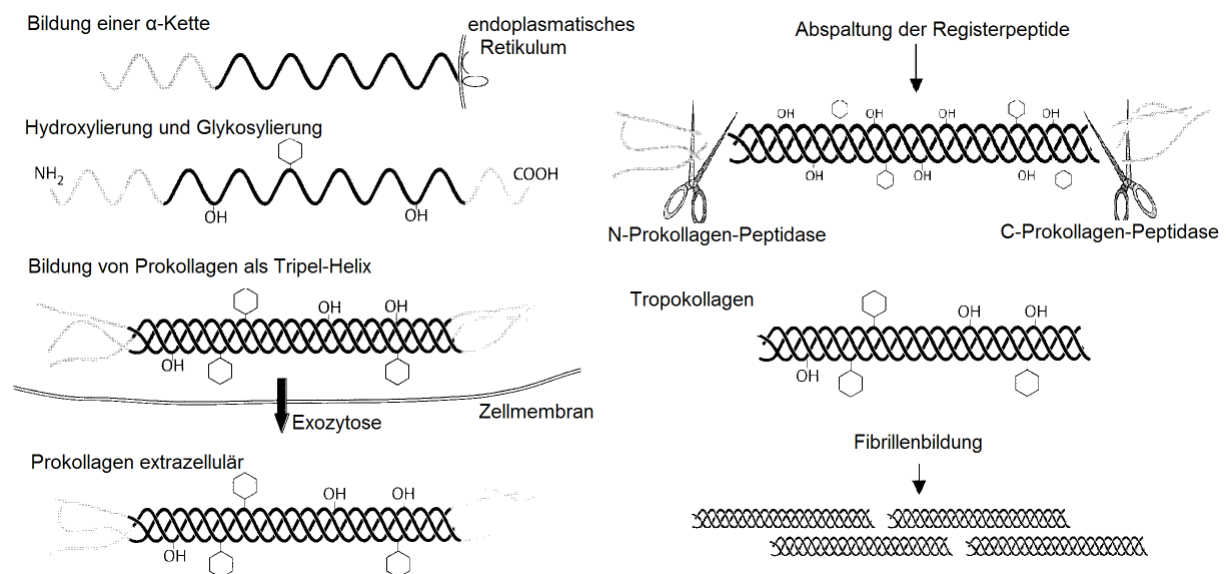


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese intra- und extrazellulär [van den Berg und Cabri 2003]

Cross-links können u.a. auch durch Cystin-Disulfide ausgebildet werden. Dieser Mechanismus ist bei den meisten nicht-fibrillären Kollagenen die oft einzige kovalente intra- und intermolekulare Verbindung [Eyre und Wu 2005].

2.2 Vorkommen und Extraktion von Kollagen

Kollagene sind Bestandteile der Bindegewebe. Anders als bei anderen Geweben ist das Bindegewebe nicht ausschließlich aus Zellen aufgebaut. Es besteht hauptsächlich aus der extrazellulären Matrix (ECM). Diese besteht aus Gewebeflüssigkeit, den Kollagenfasern bzw. elastischen Fasern und einer Grundsubstanz. Die Zellen des Bindegewebes sind in diese Matrix eingebettet. Zu Ihnen gehören die ortsständigen Zellen (Adipozyten, Chondroblasten, Osteoblasten, Fibroblasten) und die freien Zellen (Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, Plasmazellen). Die freien Zellen treten gehäuft bei Entzündungsvorgängen auf. Die Hauptproduzenten von Kollagen sind die Fibroblasten zusammen mit den Osteoblasten und den Chondroblasten. Die wichtigsten Bestandteile der Grundsubstanz selbst stellen die Proteoglykane (an ein Zentralprotein gebundene Glykane) sowie die Glykoproteine dar. Glykane sind unverzweigte Polysaccharidketten, die aus Disacchariden, meist aus Glukosamin oder Galaktosamin und Glukuronsäure bzw. Iduronsäure, aufgebaut sind [Jungueira et al. 2005]. Aufgrund der hohen Mengen an Carboxyl- und Sulfatgruppen können im Bindegewebe viele Wassermoleküle und Ione gebunden werden (hydrophiler Charakter), was zur Folge hat, dass schon bei einer geringen Konzentration eine gelartige Struktur ausgebildet wird. Die Kollagene sind fest mit den Makromolekülen der Grundsubstanz verbunden. Es entsteht ein Netzwerk, mit dem Zellinteraktionen möglich werden [Ayad et al. 1998].

Das Bindegewebe unterteilt man allgemein in retikuläres, lockeres, straffes und spezielles Bindegewebe (Tab. 2). Straffes Bindegewebe ist sehr stark quer vernetzt. Viele genetische Krankheiten resultieren aus fehlerhafter Synthese von Kollagen, wie das Marfan-Syndrom [Hirsch-Kauffmann und Schweiger 2000].

Tabelle 2: Eigenschaften und Vorkommen wichtiger Bindegewebsarten [Jungueira et al. 2005]

Bindegewebsarten	Eigenschaften	Vorkommen
Retikuläres	spezielle Retikulinfasern	lymphatische Organe, Knochenmark, Leber, Niere
Lockeres	viel Grundsubstanz wenig Fasern Ort von Entzündungsvorg.	im Stroma von Organen, in Gewebslücken und Verschiebeschichten
Straffes	Fasern überwiegen (geflechtartig/parallelfaserig)	Dermis, Sklera des Auges, Organkapseln, Sehnen
Spezielles	Fettspeicher Stützgewebe	Fettgewebe, Knorpel und Knochen

Das Bindegewebe von Knochen als Stützgewebe, muss in der Lage sein, hohen Belastungen standzuhalten. Die sehr harte Struktur entsteht dadurch, dass sich die Matrix nicht an Wasser bindet, sondern an Mineralien. Kollagene Fasern (hauptsächlich Typ I) werden von Hydroxylapatit-Kristallen umgeben und stabilisiert [van den Berg und Cabri 2003]. Die Arbeitsgruppe um *Thompson et al.* (2003) von der Universität Santa Barbara untersuchte in diesem Zusammenhang die Stabilität von Knochen. Durch Belastungen werden die Kollagenfasern gestreckt und es brechen kovalente Verbindungen („sacrificial bonds“). Dadurch ist das Kollagen in der Lage hohe Mengen an Energie zu absorbieren. Nach der Entlastung bilden sich die zerstörten Bindungen wieder aus.

2.2.1 Die Kollagenfamilie

In Tabelle 3 ist eine Einteilung der Kollagentypen nach ihren Strukturmerkmalen dargestellt. Dabei repräsentieren die Typen I, II, III und IV ca. 95% des gesamten Kollagens [van den Berg und Cabri 2003].

Tabelle 3: Charakterisierung der Kollagentypen nach Strukturmerkmalen [Koide und Nagata 2005; Ricard-Blum et al. 2005; Cowin und Doty 2007; Kadler et al. 2007]

Kollagenfamilie	Kollagentyp
Fibrilläre Kollagene (fibril-forming collagens)	I, II, III, V, XI XXIV, XXVII
Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix (FACITs)	IX, XII, XIV XVI, XIX, XX, XXI, XXII
Transmembrane Kollagene (transmembrane collagens)	XIII, XVII, XXIII, XXV
Mehrfache tripel-helikale Kollagene mit Unterbrechungen-Multiplexin Kollagene (endostatin-producing collagens)	XV, XVIII
Perlenschnurförmige Filamente bildende Kollagene (beaded-filament-forming collagen)	VI, XXVI, XXVIII
Verankerungsfibrillenbildendes Kollagen der Basalmembran (anchoring fibrils)	VII
Netzwerkbildende Kollagene (network-forming collagens)	IV, VIII, X

Offizielle Kriterien zur Erfüllung einer Nomenklatur der Kollagene existieren nicht. Allgemein zählt ein Protein zur Superfamilie der Kollagene, wenn tripel-helikale (COL) Bereiche vorliegen, makromolekulare Aggregate ausgebildet werden und es in der extrazellulären Matrix zu finden ist. Die meisten Familienmitglieder erfüllen diese Kriterien. Jedoch bilden die transmembranen Kollagene keine makromolekularen Strukturen aus, bestehen aber aus kollagenen Bereichen, lokalisiert in der ECM. Ebenso bestehen die Multiplexine aus

mehrfachen tripel-helikalen Bereichen mit Unterbrechungen. Diese befinden sich jedoch in Zonen der Basalmembran und die makromolekulare Struktur ist nicht bekannt. Umgekehrt bestehen einige Proteine wie das Emilin aus COL, bilden makromolekulare Aggregate aus und sind in der extrazellulären Matrix zu finden. Emilin wird jedoch nicht als Kollagen klassifiziert (collagen-like protein)[Richard-Blum et al. 2005].

Die ersten Kollagentypen (I-XI) wurden mittels biochemischer Methoden charakterisiert. Die Typen XII bis XIX sind zuerst als c-DNA Klone entdeckt worden. Die Erkenntnis über neuere Kollagentypen erfolgt heutzutage über c-DNA Bibliotheken (genome sequencing) [Richard-Blum et al. 2005].

Kollagene besitzen neben den helikalen Domänen (COL) auch nicht helikale Bereiche (NC) an den N- und C-Termini. Weiterhin kann die Tripelhelix aus drei identischen α -Polypeptidketten (Homotrimer) aufgebaut sein oder als Heterotrimer aus unterschiedlichen α -Ketten bestehen. Die Primärstruktur dieser Ketten ist von Typ zu Typ unterschiedlich. Die Darstellung der individuellen Ketten erfolgt in der Form: $\alpha_n(N)$. Der Buchstabe n bezeichnet die Nummer der α -Kette und N den Kollagentyp (römische Ziffer) [Fratzl 2008].

2.2.2 Fibrilläre Kollagene

Wichtige fibrilläre Kollagentypen hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus und ihres Vorkommens sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Aufbau und Vorkommen der Typen I, II, III und V [Brinckmann 2005]

Kollagentyp	molekularer Aufbau	α -Polypeptidketten Komposition	Vorkommen
I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ $[\alpha_1(I)]_3$	$\alpha_1(I)$ $\alpha_2(I)$	weitverbreitet; Haut, Knochen, Sehnen, Bänder, Kornea geringere Bedeutung (Haut, Tumorzellen)
II	$[\alpha_1(II)]_3$	$\alpha_1(II)$	Knorpel, Glaskörper
III	$[\alpha_1(III)]_3$	$\alpha_1(III)$	Bestandteil Retikulin-Faser; oft in Verb. mit Typ I; Haut, Gefäße, Darm, Uterus
V	$[\alpha_1(V)]_3$ $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$ $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$	$\alpha_1(V)$ $\alpha_2(V)$ $\alpha_3(V)$	geringe Mengen, verbreitet in Verb. mit Typ I bzw. Typ I/III Haut, Knochen, Plazenta, Kornea

Wie bereits bei der Biosynthese erwähnt, bilden die fibrillären Kollagene supramolekulare Strukturen in Form von Fibrillen und Fasern aus. Das charakteristische Querstreifenmuster (Abb. 1 D, E) weist dabei eine D-Periodizität von 67 nm auf.

Abbildung 4 zeigt den Prototyp einer allgemeinen Kettenstruktur. Die Pro(α)-Kette besteht aus einer längeren helikalen Domäne (COL1), welche an den N- und C-Terminus durch die N- und C-Propeptide begrenzt wird (Biosynthese). Der nicht-helikale Bereich NC2 verbindet die lange helikale Domäne (COL1) mit einer kürzeren (COL2) und einem globulären N-Terminus (NC3). Dieses globuläre Ende zeigt je nach Typ strukturelle Variationen auf.

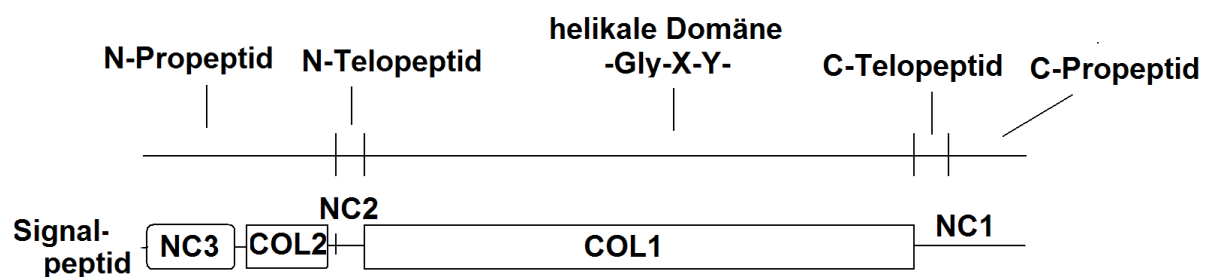


Abbildung 4: Allgemeine Proteindomäne fibrillärer Kollagene

Kollagentyp I

Aufgrund seines reichhaltigen Vorkommens zählt das Kollagen vom Typ I zu den ersten und damit am besten erforschten Typen. Es repräsentiert die Primärstruktur aller Kollagene und macht ca. 80 % der gesamten Kollagene aus. Durch die charakteristische Ausbildung von Fibrillen (Abb. 1 D) bzw. durch die Synthese zu Fasern und Faserbündeln ist es in allen Geweben zu finden, welche unter Zugbelastungen stehen. Hierzu zählen Kapseln, Bänder, Sehnen, intramuskuläres und intraneurales Bindegewebe.

Ebenso besteht die Haut (Dermis, Subcutis) hauptsächlich aus diesem Typ und auch in Knochen ist es überwiegend zu finden [van den Berg und Cabri 2003]. Anhand der Arbeiten von *Piez et al.* im Jahre 1963 wurde erstmals gezeigt, dass das Kollagenmolekül während der Denaturierung in monomere (α -Ketten), dimere und trimere Komponenten, sowie in höhermolekulare Fraktionen zerfällt. Durch Isolierung dieser Fragmente mit Hilfe der Chromatografie wurde der Beweis erbracht, dass das Kollagenmolekül-Typ I aus zwei identischen α_1 -Polypeptidketten und einer α_2 -Kette besteht und damit ein Heterotrimer ist. Die vollständige Aufklärung der Primärstruktur der α_1 -Kette erfolgte in den 70er Jahren [Fietzek und Kühn 1975].

Die Pro(α_1)-Kette setzt sich aus 1464 AS zusammen (Abb. 5). Die helikale Domäne (COL1) besteht aus 1013 AS.

Innerhalb der helikalen Domäne ist das Tetrapeptid -Asp-Gly-Glu-Ala- für die Zellinteraktion mit den Zellen der extrazellulären Matrix über den $\alpha_2\beta_1$ -Integrin Rezeptor verantwortlich [Ayad et al. 1998].

Der NC3 Bereich ist reich an Cystein, weshalb dieser als CRR (cystein-rich repeat) Domäne bezeichnet wird [Richard-Blum et al. 2005]. Insgesamt besteht die CRR Domäne aus 10 Cysteinen [Bornstein 2002].

Dem N-Propeptid werden folgende Funktionen zugeordnet: Initialisierung der tripel-helikalen Formation, Hemmung der intrazellulären Fibrillenbildung und Förderung des intra- und extrazellulären Transports des Prokollagenmoleküls [Bornstein 1974; Martin et al. 1975]. Ebenso reguliert es rückwirkend die Prokollagen-Biosynthese. Demzufolge ist die N-terminale Region eine sehr stabile Domäne, weshalb das N-Terminus des Kollagenmoleküls resistenter gegenüber enzymatischer Spaltung ist.

Die Pro(α_2)-Kette besitzt keine CRR Domäne. Sie setzt sich aus 1366 AS zusammen (Abb. 5).

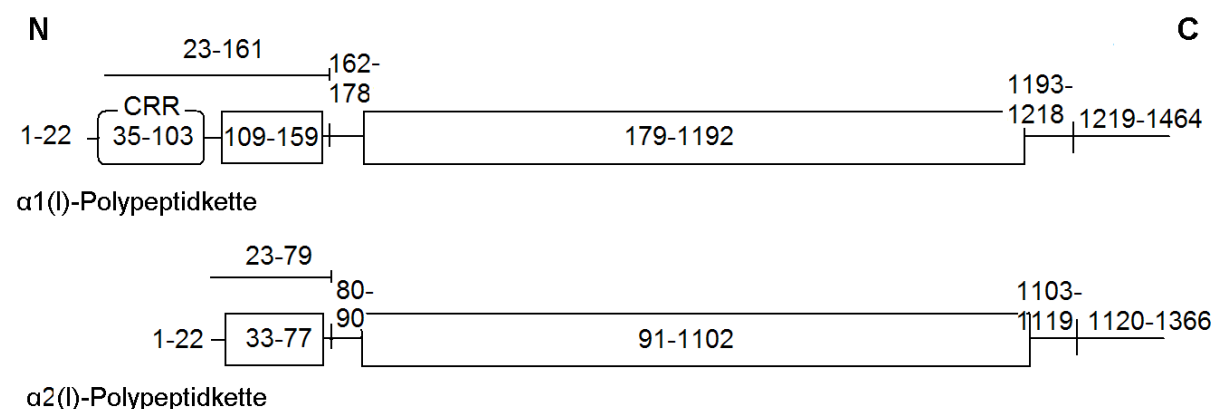


Abbildung 5: Domänen der α_1 - und α_2 -Propolypeptidketten des Typ I. Die Zahlen entsprechen der Reihenfolge der AS (Primärstruktur). Die ersten 22 AS entsprechen dem Signalpeptid.

Von geringerer Bedeutung (nicht signifikant im normalen Gewebe) ist das Kollagentyp I bestehend aus drei α_1 -Polypeptidketten. Dieser Homotrimer wurde u.a. in Tumorzellen, Haut, embryonalen Gewebe und kultivierten Zellen lokalisiert [Jimenez et al. 1977; Moro und Smith 1977; Shupp-Byrne und Church 1982].

Kollagentyp III

Dieser Typ ist ein wichtiger Bestandteil der retikulären Faser im interstitiellen (dazwischenliegenden) Gewebe von Lunge, Leber, Haut, Milz und Gefäßen [Gelse et al. 2003] sowie innerhalb von Organen. Die Fasern werden von einer dünnen Schicht aus Proteoglykanen und Vernetzungsproteinen umgeben. Typ III tritt oft in Verbindung mit Typ I auf [van den Berg und Cabri 2003]. Die Dicke der Faser variiert von 0,2 bis 1 μm . Im

Gegensatz dazu beträgt die Dicke der Kollagen-Faser des Typ I 1 bis 12 μm [Kunsch und Kunsch 2000].

Die Biosynthese erfolgt aus drei identischen Pro(α_1)-Ketten (Homotrimer), bestehend aus 1466 AS, wobei die helikale Domäne aus 1028 AS besteht. Typ III besitzt wie Typ I CRR Domänen innerhalb des N-Terminus. Anders als beim Typ I bilden sich zwischen den Ketten Disulfidbrückenbindungen am C-Terminus der Tripelhelix aus [Ayad et al. 1998].

2.2.3 Extraktionsmethoden

Mit zunehmendem Alter steigt der Grad der Quervernetzungen im Bindegewebe. Im jungen Gewebe sind die Tropokollagene hauptsächlich intramolekular vernetzt, was zur Folge hat, dass das Kollagen durch bloße Extraktion gelöst werden kann. Je nach Extraktionsmethode unterscheidet man zwischen säurelöslichem (SLK) und neutralsalzlöslichem Kollagen. Mit der Zeit erfolgt ein Übergang des löslichen Tropokollagens zur unlöslichen Kollagenfaser. Grund hierfür sind die intermolekularen Vernetzungen. Versuche an Rattengewebe von *Kühn et al.* im Jahre 1963 zeigten, dass die unterschiedlichen Vernetzungen zur gleichen Zeit entstehen. Aufgrund der Tertiärstruktur (Tripelhelix) sind die Moleküle streng zueinander geordnet, was einen Vorteil in der Ausbildung der intramolekularen Verbindungen zur Folge hat. Das SLK stellt dabei einen Übergang dar, in dem überwiegend intramolekulare Quervernetzungen vorliegen [Bailey et al. 1998].

Die Entwicklung einer Standardmethode für alle Kollagentypen ist schwierig zu realisieren. Die Kollagentypen variieren zu stark in ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrem Vorkommen in den diversen Bindegewebsarten. Die gebräuchlichsten Extraktionen finden mit **sauren Lösungen** bzw. mit **Neutralsalzlösungen** statt [Borel und Randoux 1985].

Neutralsalzlösungen

Um neutralsalzlösliches Kollagen aus Bindegewebe zu solubilisieren, werden hauptsächlich Natriumchlorid-Lösungen (NaCl-Lösungen) verwendet. Die genauen NaCl-Konzentrationen schwanken in den Veröffentlichungen von 0,15 M bis 2 M [Friess 1998]. *Byers et al.* (1974) verwendeten bei der Präparation von Typ III Prokollagen und Kollagen aus Rattenhaut eine 0,15 M NaCl-Lösung, wobei NaCl in einem Puffer (0,02 M EDTA; 0,05 M Tris/HCl pH 7,4) gelöst wurde. *Bornstein und Piez* (1964) nutzten eine Solubilisierungslösung bestehend aus 1 M NaCl und einem 0,02 M Tris/HCl Puffer (pH 7,4), um Kollagen aus menschlicher Haut zu gewinnen. Weiterhin werden auch neutrale Phosphat-Puffer für die Extraktion verwendet. Die Extraktion von neutralsalzlöslichem Kollagen erfolgt in der Regel für 24 Stunden bei 4 °C [Friess 1998]. Zusätzlich wird die Ausbeute durch die Aktivität von Proteasen im Gewebe

beeinflusst. Durch Zugabe von Inhibitoren (EDTA, DFP) während der Extraktion kann die enzymatische Spaltung gering gehalten werden [Miller et al. 1982].

Durch anschließende Dialyse, Ausfällung und Zentrifugation kann das extrahierte Kollagen gereinigt werden [Friess 1998]. Gewöhnlich wird die Dialyse bei 4 °C gegen eine schwache Säure (Essigsäure) durchgeführt [Borel und Randoux 1985].

saure Lösungen

Extraktionen mit sauren Lösungen erreichen in der Regel eine höhere Ausbeute an Kollagen. Gebräuchlicherweise werden Essigsäure, Salzsäure und Zitrat-Puffer eingesetzt [Friess 1998]. Darunter sind Extraktionen mit Essigsäure sehr gängig. Die Konzentration an Kollagen steigt mit der Molarität an Essigsäure [Bazin und Delaunay 1976], wobei eine zu konzentrierte Säure das Kollagen verändert [Kessler et al. 1960]. Verbreitet sind 0,5 M Lösungen [Borel und Randoux 1985; Friess 1998].

Mit den sauren und Neutralsalzlösungen können ungefähr 2 % an Kollagen aus Gewebe gelöst werden [Friess 1998]. Der Großteil hingegen ist unlöslich. Aus diesem Grund wird dem Extrakt häufig Pepsin zugesetzt. Pepsin spaltet die Telopeptide ab (Quervernetzungen), wodurch ein höherer Gehalt an Kollagen extrahiert werden kann. Gleichzeitig besteht aber auch die Gefahr, dass das Kollagen gespalten wird. Dennoch ist diese Extraktionsmethode weit verbreitet [Chandrakasan et al. 1976].

Fraktionierte Salzfällung

Kollagen ist in Medien verschiedener Ionenstärken unterschiedlich löslich. Diese Tatsache ermöglicht es, Kollagentypen mit Hilfe bestimmter Salzkonzentrationen zu trennen. In der Extraktionslösung wird die Salzkonzentration stetig erhöht. Dadurch kommt es zu separaten Ausfällungen der verschiedenen Typen und die einzelnen Präzipitate können abzentrifugiert und gesammelt werden.

Die Salzfällungen nach sauren Extraktionen finden üblicherweise mit NaCl in einer 0,5 M Essigsäure statt. Die Typen I und III fallen bis zu einer Konzentration um 0,7 M aus [Laurain et al. 1980; Rhodes und Miller 1978]. Typ V präzipitiert bei einer 1,2 M NaCl-Lösung [Borel und Randoux 1985].

Nach Neutralsalz-Extraktionen werden erfolgreiche Salzfällungen in 0,05 M Tris-HCl-Puffern (pH 7,5) mit 1 M NaCl bei 4 °C durchgeführt [Chung und Miller 1974; Lapière et al. 1977]. Bei einer Konzentration im Bereich 1,5-1,7 M fällt Typ III aus. Durch weitere langsame Zugabe von NaCl kommt es zur Ausfällung von Typ I bei 2,4 M [Borel und Randoux 1985]. Zwischen 3 und 4,5 M Lösung präzipitiert ausschließlich Typ V [Rhodes und Miller 1978].

2.3 Kollagenfragmente

Anhand spezifischer Hydrolysefragmente können unterschiedliche Kollagentypen identifiziert werden. Die Erzeugung der Fragmente kann zum einen chemisch, zum anderen enzymatisch erfolgen.

2.3.1 Bromcyan-Spaltung

Die Größe der α -Ketten sorgte zunächst für Probleme bei der Untersuchung der Primärstruktur der Kollagene. Deshalb war eine vorherige Fragmentierung der Ketten unerlässlich. Erstmals wurde 1962 durch *Gross und Witkop* eine Methode der nicht-enzymatischen Proteinspaltung durch Bromcyan (BrCN) eingeführt. *Bornstein und Piez* übertrugen diese Erkenntnisse im Jahre 1965 auf Kollagene.

BrCN spaltet die Peptidbindungen, die nach einem Methioninrest folgen, auf der C-terminalen Seite. Methionin kommt nur begrenzt in Kollagenen (Proteinen) vor. Dadurch entstehen nur wenige Fragmente, welche eine eindeutige Bestimmung und Zuordnung ermöglichen.

Die Reaktion wird im sauren Milieu durchgeführt. In diesem Fall tritt der Methioninrest als S-Nukleophil auf, das die Bindung des Bromcyans attackiert und dabei Brom freisetzt (Abb. 6).

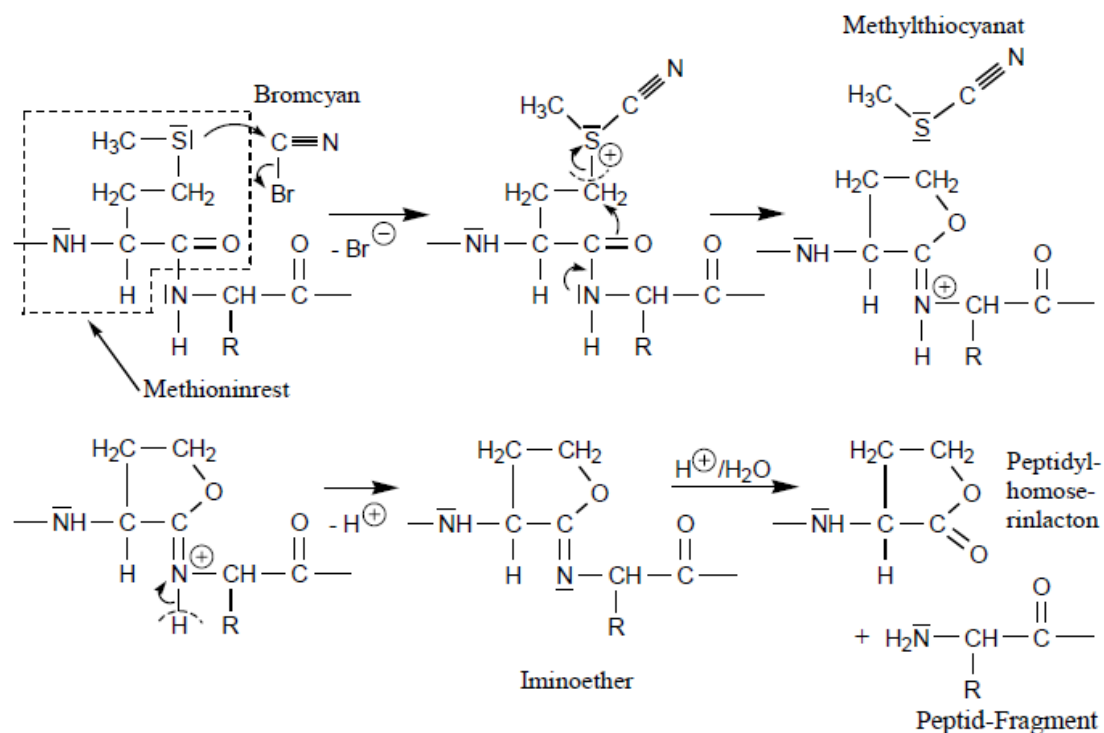


Abbildung 6: Reaktionsschema der BrCN-Spaltung [Wollrab 2009]

Die C-S-Bindung im Zwischenprodukt wird durch die positive Ladung am Schwefel (Sulfonium-Ion) polarisiert, wodurch diese Gruppe eine gute Abgangsgruppe darstellt. Mit der

Abspaltung von Methylthiocyanat tritt eine Zyklisierung ein und es wird ein zyklischer Iminoether gebildet. Durch Zugabe von Wasser wird die Iminogruppe (C=N-) hydrolysiert (Abb. 6) [Wollrab 2009].

Die Spaltung mit BrCN ist im Allgemeinen zu 90-95 % vollständig. Zusätzlich können die Reagenzien aufgrund der hohen Volatilität leicht entfernt werden [Rehm 2006]. Diesbezüglich hat sich in der Vergangenheit vor allem 70 %(v/v) Methansäure bewährt. Diese löst und denaturiert die Proteine sehr gut. Sie kann aber auch Veränderungen an den AS Tryptophan und Tyrosin [Morrison et al. 1990] verursachen. Aus diesem Grund werden auch andere Säuren, wie zum Beispiel Trifluoressigsäure verwendet [Smith 2007].

BrCN wird in einem molaren Überschuss bezogen auf Methionin in die Probenlösung gegeben. Bei der Kollagenspaltung haben sich Methoden etabliert, bei denen die Spaltung mit einem 100 bis 1000 fachen Überschuss an BrCN erfolgt. *Butler und Ponds* (1971) lösten Kollagen (Rattenhaut) in 70 %(v/v) Methansäure und inkubierten die Lösung mit einem 100 fachen Überschuss bei Raumtemperatur (RT) für 4 Stunden. *Borel und Randoux* (1985) beschreiben eine Inkubation bei 30°C (4 Stunden) unter einer Stickstoffatmosphäre.

Die entstandenen Peptide werden mit dem Kürzel CB bezeichnet. Die Nomenklatur der BrCN-Peptide (CB) ist entsprechend der Darstellung der Kollagentypen: $\alpha_n(N)$. So entstehen bei der BrCN-Spaltung von Typ I-Kollagen Peptide in Form von $\alpha_1(I)$ -CB- und $\alpha_2(I)$ -CB. In Tabelle 5 sind die Molmassen einiger Peptide (CB) des Typ I dargestellt. Die Nummerierung der Peptide ergibt sich aus der Reihenfolge ihrer Elution an einer Carboxylcellulose-Säule (Abb. 7).

Tabelle 5: Molmassen einiger CB von Typ I-Kollagen [Furthmayr und Timpl 1970; van der Rest et al. 1980]

BrCN-Peptid	Molmasse [kg/mol]
$\alpha_2(I)$ -CB 3-5	60
$\alpha_1(I)$ -CB 3-7, CB 3-8	38
$\alpha_2(I)$ -CB 4	30
$\alpha_1(I)$ -CB 7, CB 8	25
$\alpha_1(I)$ -CB 6	19
$\alpha_1(I)$ -CB 3	13

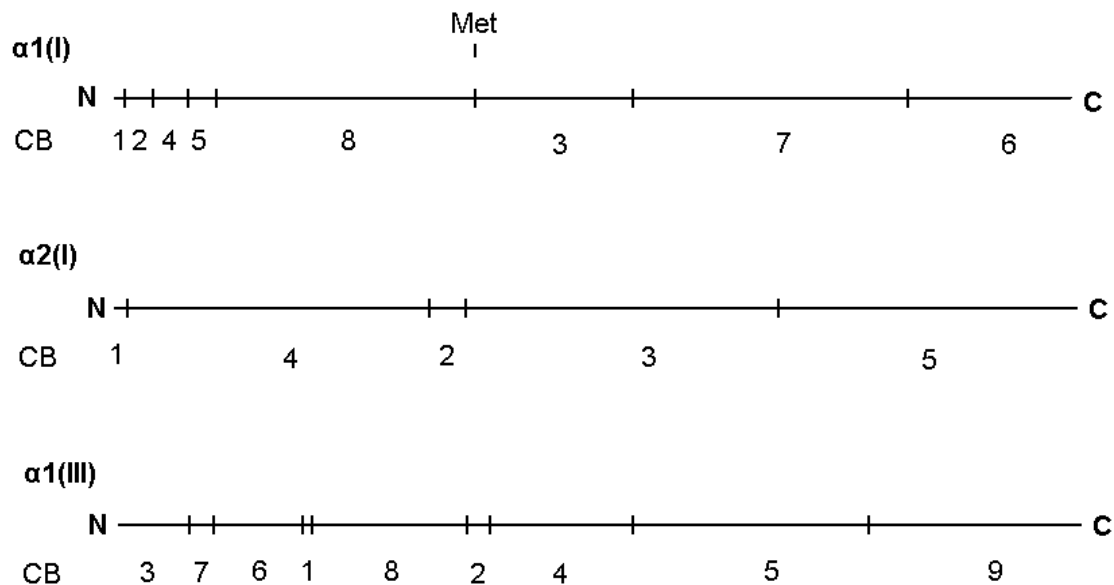


Abbildung 7: CB von $\alpha_1(I)$, $\alpha_2(I)$ und $\alpha_1(III)$. Die vertikalen Striche deuten die Methionin-Positionen an. [Henkel und Dreisewerd 2007; Tanaka et al. 1981].

2.3.2 Enzymatische Spaltung

Die Auswahl geeigneter Enzyme zur Gewinnung von Hydrolysefragmenten ist für die Charakterisierung von Kollagentypen entscheidend. Die Spaltstellen können innerhalb bzw. an den Enden der Peptidketten liegen. Endopeptidasen spalten innerhalb der Kette und Exopeptidasen am Terminus. Letztere können weiter in Carboxy- und Amino-peptidasen unterschieden werden. Die Klassifizierung der Peptidasen erfolgt anhand ihrer reaktiven Gruppe im aktiven Zentrum. Diesbezüglich gibt es Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metallo- und Threoninproteasen [Clark und Pazdernik 2009]. Im aktiven Zentrum wird das Substrat gebunden und die Reaktion katalysiert. Demzufolge umfasst das aktive Zentrum katalytisch wirksame und bindende Aminosäureseitenketten [Buchholz und Kasche 1997].

Anders als bei den meisten anderen Enzymen sind Proteasen nicht spezifisch auf bestimmte Substrate eingestellt. Vielmehr liegt ihre Spezifität auf bestimmten Strukturmerkmalen innerhalb der Peptidketten. Die Spaltung erfolgt bevorzugt vor oder hinter bestimmten Aminosäure-Resten. Weiterhin werden denaturierte Proteine leichter hydrolysiert als native [Karlson et al. 1994]. Eine Charakterisierung bedeutender Proteasen hinsichtlich ihrer spezifischen Spaltstellen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Charakterisierung einiger Serin- und Metallo-Proteasen hinsichtlich ihrer Spaltstellen sowie des Bildungsortes und Hemmstoffe [Karlson et al. 1994; BRENDA 2010]

Enzym	Typ	Bildungsort	Bevorzugte Spaltstellen	Inhibitoren (Auswahl)
Chymotrypsin	Serin-Protease (Endopeptidase)	Pankreassekret	Tyr-/Xaa Trp-/Xaa Leu-/Xaa	PMSF DFP
Kollagenase	Metallo-Protease (Endopeptidase)	Bakterien Wirbeltiere (Vertebrata)	Gly-/Bindung (helikale Domäne) Gly-/Leu Gly-/Ile	EDTA DDT
Thermolysin	Metallo-Protease (Endopeptidase)	Bakterien	-/Leu > -/Phe -/Ile	

Die Peptidbindung wird mittels Hydrolyse gespalten (Abb. 8). Eine Peptidbindung entsteht durch eine Kondensationsreaktion zwischen der Carboxylgruppe und der Aminogruppe zweier AS [Brown et al. 2007]. Dabei entsteht Wasser. Die Hydrolyse stellt dabei die Umkehrung der Kondensationsreaktion dar. Durch Einlagerung von Wasser werden die Peptide gespalten. Diese Reaktion kann enzymatisch stattfinden, weil die Enzyme die Aktivierungsenthalpie der chemischen Reaktion herabsetzen [Grossauer 2006]. Um eine optimale Aktivität und damit Wirkung der Enzyme zu gewährleisten, sind die Temperatur, der pH-Wert oder die Salzkonzentration bedeutende Faktoren [Fuchs und Schlegel 2007].

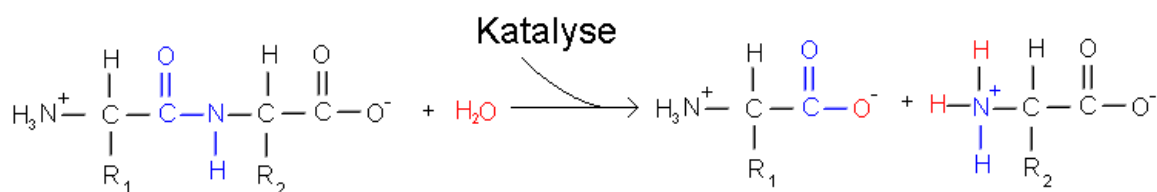


Abbildung 8: Hydrolyse der Peptidbindung

Serin-Proteasen

Serin-Proteasen besitzen einen Serinrest im aktiven Zentrum. Dieser bindet als enzymatische Zwischenstufe kovalent an eines der Proteinfragmente [Clark und Pazdernik 2009].

Wichtige Vertreter dieser Gruppe wie Trypsin und Chymotrypsin werden im Pankreas gebildet und spielen als Verdauungsenzyme bedeutende Rollen im Stoffwechsel. Zunächst werden in den exokrinen Zellen des Pankreas inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert

und intrazellulär im Zymogengranula gespeichert. Diese Vorstufen bestehen aus längeren Peptidketten. Die Aktivierung erfolgt durch Abspaltung einer Teilsequenz. Das inaktive Chymotrypsinogen wird beispielsweise unter der Katalyse von Trypsin zu Chymotrypsin umgewandelt [Löffler und Petrides 1998]. Die durch die Spaltung verursachte Konformationsänderung führt zur Ausbildung des aktiven Zentrums [Karlson et al. 1994].

α -Chymotrypsin besitzt eine relative Molekülmasse von ca. 25 kDa. Es besteht aus drei Polypeptidketten (A-, B- und C-Kette) mit insgesamt 245 Aminosäure-Resten [Pühler et al. 2000]. Die linearen Polypeptidketten sind untereinander durch fünf Disulfidbrücken intra- und intermolekular verbunden [Niemann 1964]. In Abbildung 9 ist die Aminosäuresequenz der Peptidketten mit den Disulfidbrücken dargestellt.

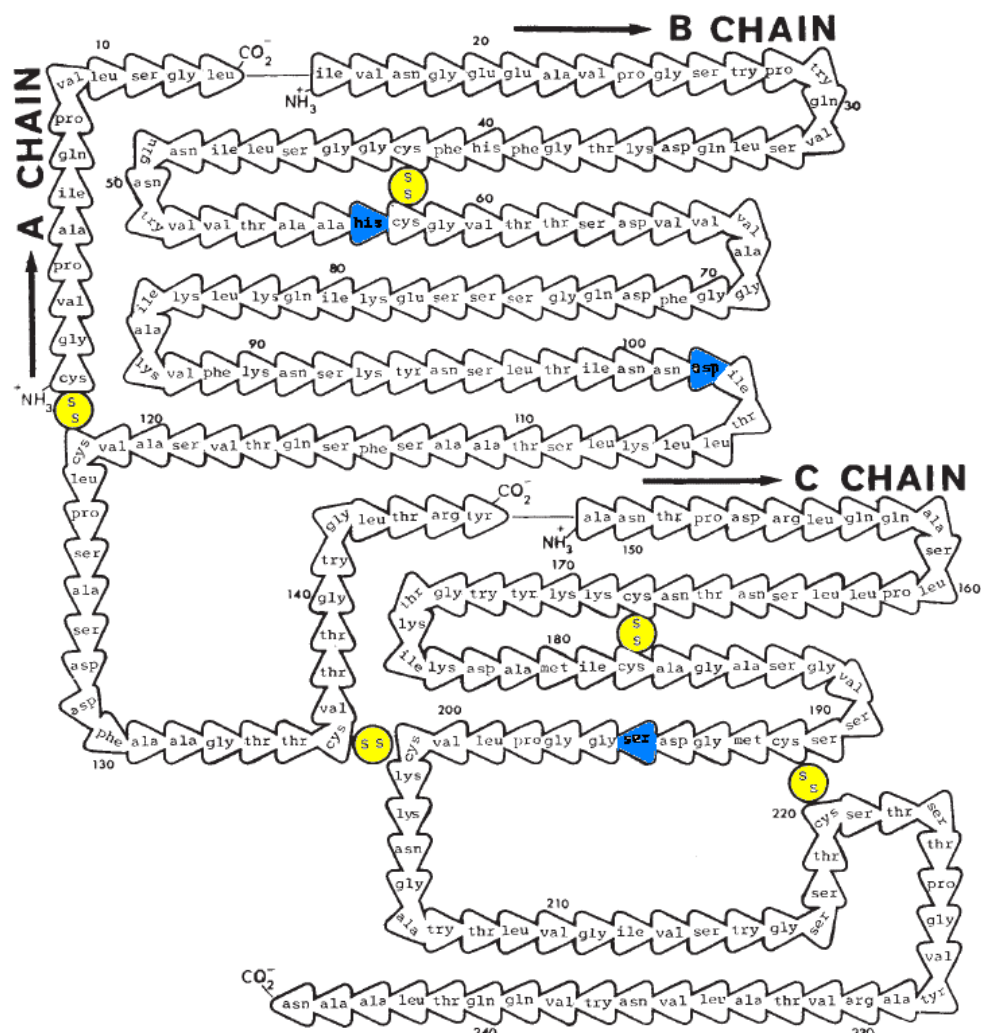


Abbildung 9: Die Aminosäuresequenz von α -Chymotrypsin. Die gelb markierten Kreise symbolisieren die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den drei Polypeptidketten A, B und C. Die blau markierten AS stellen die Position der katalytischen Triade innerhalb der Ketten dar (His57, Asp102, Ser195) [Matthews et al. 1967].

α -Chymotrypsin spaltet bevorzugt Peptidbindungen, die in der Peptidkette an der Carboxylgruppe nach Tyrosin, Tryptophan und Leucin stehen [BRENDA 2010].

Die optimale Wirksamkeit entfaltet sich bei einem pH Wert von 8, wobei das Optimum je nach Organismus variieren kann. An der Reaktion des α -Chymotrypsin (Abb. 10) sind die AS Asparaginsäure (Asp), Histidin (His) und Serin (Ser) beteiligt (Abb. 9). Diese Aminosäure-Reste sind untereinander durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden und werden als katalytische Triade bezeichnet. Durch die Konformation der Polypeptidketten entsteht ein hydrophobes aktives Zentrum, bei der die Katalyse aromatischer Aminosäure-Einheiten begünstigt wird.

Der Reaktionsmechanismus besteht aus der Phase der Spaltung (Acylierung von Serin) und der Phase der Enzymregenerierung (Deacylierung von Serin) [Grossauer 2006].

Der Sauerstoff der OH-Gruppe der Serin-Einheit greift nukleophil die Carbonylgruppe der Peptidbindung des Substrates an. Dieser Effekt wird durch die Wasserstoffbrückenbindung im aktiven Zentrum verstärkt (Abb. 10 A) Es entsteht ein Zwischenprodukt, welches mit vier Einzelbindungen am C-Atom eine tetraedrische Geometrie aufweist (Abb. 10 B). Aufgrund der positiven Ladung des Sauerstoffes wird die OH-Bindung polarisiert und ein Wasserstoffproton (H^+) abgespalten. Dieses wird vom Imidazolring (His) aufgenommen, wodurch sich ein Imidazolium-Ion bildet (Abb. 10 C, D). Das tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt unter Deprotonierung des Stickstoffes in ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt und in ein Peptidspaltstück des Substrates mit Aminogruppe. Der Stickstoff der Aminogruppe nimmt das bei diesem Vorgang abgegebene Wasserstoffproton des Imidazolium-Ions auf (Abb. 10 E, F). Das Peptidspaltstück löst sich aus dem Komplex und an dessen Stellen tritt ein Wassermolekül. Dieses bindet sich durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke an den Stickstoff des Imidazolrings. Der Sauerstoff des Wassermoleküls greift nukleophil die Carbonylgruppe des Acyl-Enzym-Zwischenprodukts an und es bildet sich wiederum ein tetraedrischer Übergangszustand aus (Abb. 10 G, H). Durch die positive Ladung des Stickstoffes (Imidazolium-Ion) wird die N-H-Bindung polarisiert und H^+ abgespalten. Dieses wird vom Sauerstoffatom des Serinrests gebunden und das tetraedrische Zwischenprodukt wird gespalten. Es entstehen zwei Spaltstücke. Zum einem das regenerierte Enzym, zum anderen die gespaltene Polypeptidkette mit der neu gebildeten Carboxylgruppe (Abb. 10 I, J) [Wollrab 2009].

Die Hemmung des Reaktionsmechanismus kann u.a. durch PMSF oder DFP erfolgen. Diese reaktionsfähigen Säurehalogenide hemmen die Serin-Hydrolasen sehr spezifisch, indem Serin verestert wird [Karlson et al. 1994]. Dadurch ist die Bindungsstelle für das Substrat blockiert (kompetitive Hemmung).

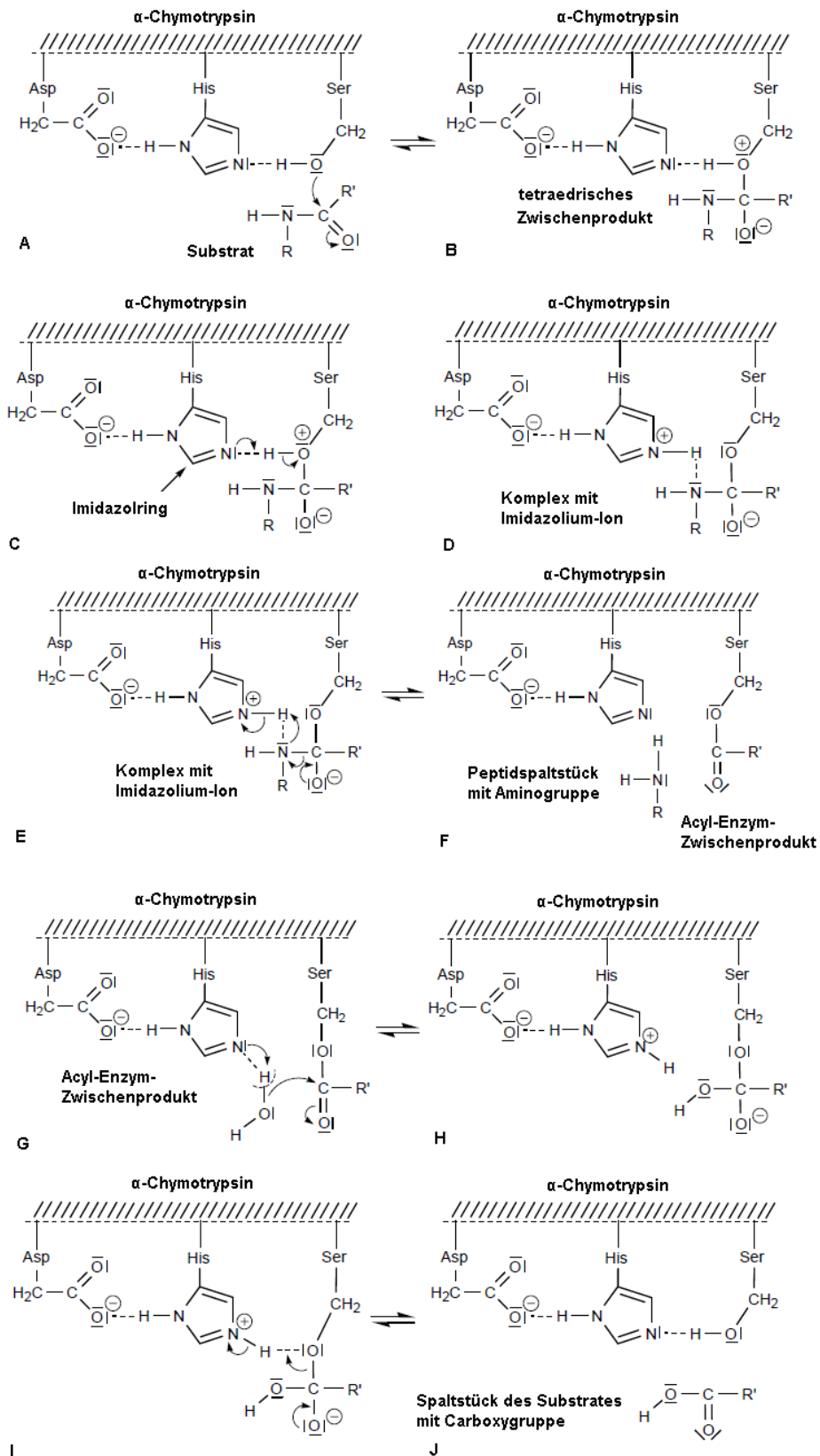


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus von α-Chymotrypsin. A-B: Nukleophiler Angriff. C-D: Bildung eines Imidazolium-Ions. E-F: Zerfall des tetraedischen Zwischenproduktes. G-H: Einlagerung und Reaktion eines Wassermoleküls. I-J: Abspaltung der Polypeptidkette und Enzymregeneration [Wollrab 2009]

Metallo-Proteasen

Für die Katalyse von Redox-Reaktionen und zahlreichen Arten von Gruppenübertragungen sind die funktionellen Gruppen der AS der Enzyme unzureichend. Aus diesem Grund sind viele physiologisch wirksame Enzyme (Holoenzyme) aus dem eigentlichen Polypeptid (Apoenzym) und einer niedermolekularen, nicht aus AS bestehenden Einheit (prosthetische Gruppe) aufgebaut. Die prosthetischen Gruppen, die nicht kovalent an das Apoenzym binden, werden als Cofaktoren bezeichnet [Grossauer, 2006]. Diesbezüglich nutzen Metallo-Proteasen Metall-Ionen (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) als Cofaktoren.

Die Gruppe der Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) enthalten Zink (Zn^{2+}) als Cofaktoren. MMP's bauen Komponenten in der extrazellulären Matrix ab, wie fibrilläre und nicht fibrilläre Kollagene, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane. Für die katalytische Aktivität benötigen die MMP neben Zn^{2+} auch Calcium-Ionen (Ca^{2+}) [Chintala und Rao 1999]. Die Subfamilie besteht aus über 20 Enzymen [Krane und Inada 2008], welche je nach ihrer Substratspezifität in Untergruppen unterteilt werden (Tab. 7).

Tabelle 7: Übersicht einiger MMP [Chintala und Rao 1999]

Untergruppe	Enzyme	Substrate
Kollagenasen	MMP-1 (Interstitial-Kollagenase) MMP-8 (Neutrophil-Kollagenase) MMP-13 (Kollagenase-3) MMP-18 (Kollagenase-4, Xenopus)	Kollagentyp I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Proteoglykane wie MMP-1 wie MMP-1 Kollagentyp I
Gelatinase	MMP-2 (Gelatinase A) MMP-9 (Gelatinase B)	Kollagentyp I, IV, V, VII, X, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Proteoglykane wie MMP-2
Stromelysine	MMP-3 (Stromelysin-1) MMP-10 (Stromelysin-2) MMP-11 (Stromelysin-3)	Kollagentyp IV, IX, X, Elastin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane wie MMP-3 α -1-Antitrypsin

Kollagene sind aufgrund der tripel-helikalen Konformation resistent gegen den Abbau durch die meisten Proteasen. Natives Kollagen kann jedoch durch Kollagenasen abgebaut werden, welche für die einzelnen Kollagentypen spezifisch sind. MMP-1 spaltet mit hoher Effizienz Typ III [Ohuchi et al. 1997] und MMP-8 ist die meist aktivste Kollagenase beim Verdau von Typ I [Hasty et al. 1990; Mallya et al. 1990].

Das typische Proenzym der Kollagenasen besteht aus einem Propeptid, einer katalytischen Domäne mit Zink-Ion, einer Prolin reichen Linker-Region und einer C-terminalen Hemopexin (Hpx) Domäne. Die Untersuchungen von *Clark und Cawston* (1989) sowie von *Murphy et al.* (1992) verdeutlichen, dass bei der Spaltung von nativem Kollagen durch MMP-1 die Hpx-Region benötigt wird. Die katalytische Domäne alleine besitzt zwar proteolytische Aktivität, ist jedoch nicht in der Lage Kollagene zu spalten. Es wird sowohl die katalytische Region als auch der C-Terminus der Kollagenasen für die Spaltung benötigt. Nachdem die Hpx-Region am Kollagen bindet, erfolgt ein örtliches Entwinden der tripel-helikalen Struktur mit anschließender Hydrolyse der spezifischen Peptid-Bindungen (Abb. 11) [Chung et al. 2004].

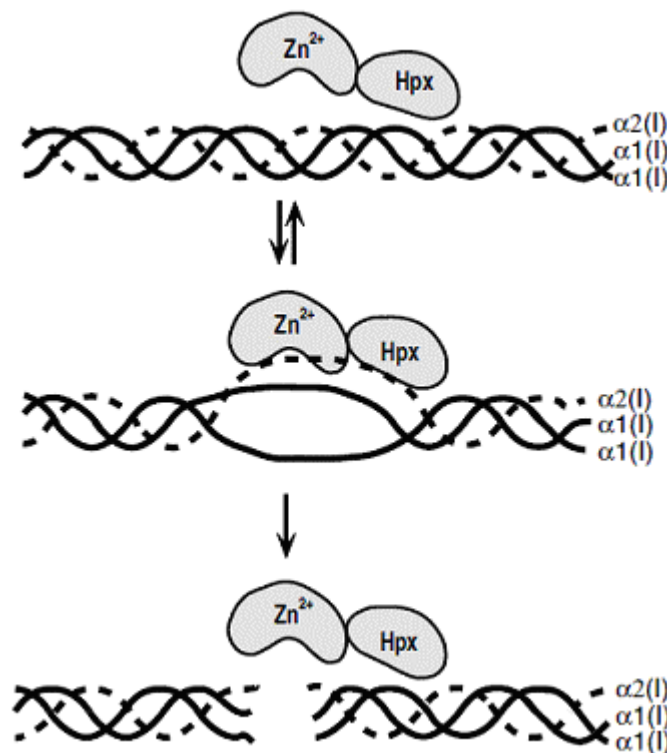


Abbildung 11: Darstellung der Stufen des Kollagenabbaus (Typ I). Bevor die Peptidbindungen gespalten werden, wird die Struktur lokal aufgelöst. Die Kollagenase bindet mit Hilfe der Hpx Domäne [Chung et al. 2004].

Zeitige Studien der Aktivität isolierter Kollagenasen aus Kaulquappen zeigten, dass natives Kollagen, extrahiert aus Säugetierhaut, in zwei Fragmente gespalten wird [Gross und Nagai

1965]. Diesbezüglich gibt es keine Unterschiede zwischen der Aktivität von Amphibien- und Säugetier-Kollagenase bzw. mikrobieller Kollagenase. Die Spaltung erfolgt zwischen Glycin und Leucin (Leu) in der α_1 -Polypeptidkette des Typ I an Position 775 und 776 (helikale Domäne). Die Spaltung innerhalb der α_2 -Polypeptidkette erfolgt ebenfalls an dieser Position zwischen Glycin und Isoleucin (Ile) (Abb. 12). Durch die Spaltung entstehen typische $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ Fragmente. Diese Fragmente besitzen eine erniedrigte Schmelztemperatur im Vergleich zur Hauptkette, was zur Folge hat, dass die Tertiärstruktur der Fragmente bei Körpertemperatur denaturiert und ihre Polypeptidketten durch weitere Proteasen gespalten werden können [Gross und Nagai 1965]. Besonders in der Region der Spaltstellen ist aufgrund der geringeren Stabilität der helikalen Struktur eine hohe proteatische Aktivität zu verzeichnen [Highberger et al. 1979].

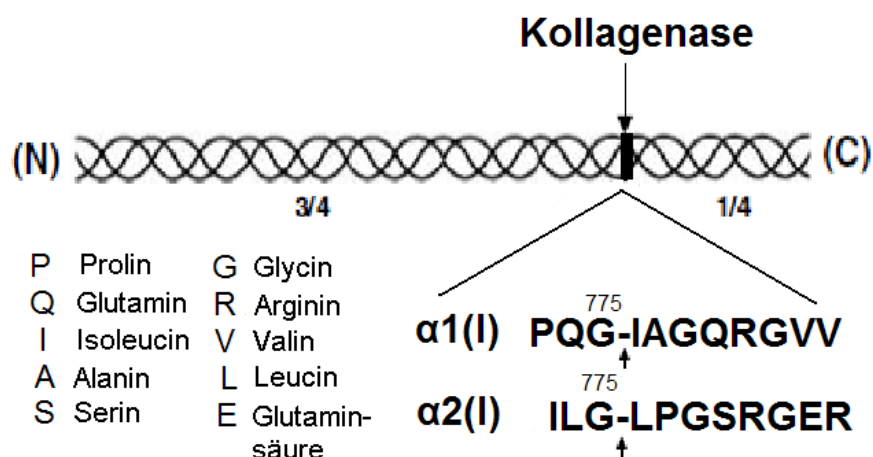


Abbildung 12: Spezifische Kollagenaseaktivität. Die bevorzugte Spaltung erfolgt zwischen der 775. und der 776. Aminosäure innerhalb der $\alpha_1(I)$ - und $\alpha_2(I)$ -Polypeptidkette (helikalen Domäne). Andere Gly-Ile und Gly-Leu Bindungen werden nicht angegriffen [Chung et al. 2004].

Die Fähigkeit Kollagenasen zu transkribieren besitzen auch Prokaryonten. Bakterien haben im Vergleich zu den Eukaryonten eine hohe Expression, was sie zu idealen Produzenten von Enzymen macht. Mikrobielle Kollagenasen spalten natives Kollagen ebenfalls in $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ Fragmente. Anschließend folgen weitere Spaltungen unspezifisch zwischen Glycin-Bindungen (X-Gly), wodurch sehr viele Fragmente entstehen können. Vor allem das im Boden vorkommende stäbchenförmige Bakterium *Clostridium histolyticum* eignet sich besonders gut, um Kollagenasen zu gewinnen. Mit Hilfe der Chromatografie an DEAE-Zellulose-Säulen wurden u. a. zwei Formen (I und II) der Kollagenase isoliert [Yoshida und Noda 1965]. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Spaltverhaltens. So greift der Typ II mehr Bindungen an als der Typ I. Untersuchungen an synthetisch hergestellten Peptiden zeigten, dass die Spaltung innerhalb einer spezifischen Teilsequenz (-Pro-X-Gly-Pro-Y-) erfolgt, wodurch -Pro-X- und -Gly-Pro-Y- Peptide entstehen. Harper und Kang (1970)

demonstrierten, dass Typ I ausschließlich zwischen dieser Bindung spaltet, Typ II jedoch weitere Stellen angreift.

Eine Charakterisierung der individuellen Typen der Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* zeigten, dass Typ I eine Molekülmasse von ca. 91 kDa aufweist und die Untereinheit in Natrium-dodecylsulfat (SDS) eine Molekülmasse von 81 kDa besitzt [Lwebuga-Mukasa et al. 1976].

Thermolysin (TLN) stellt ein weiteres Enzym aus der Gruppe der MMP dar. Es wird aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* isoliert [Endo 1962]. Für die Stabilität benötigt das Enzym vier Calcium-Ionen [Feder et al. 1971; Tajima et al. 1976]. Für die katalytische Wirkung werden Zink-Ionen benötigt. TLN spaltet bevorzugt auf der Aminosäureseite nach großen hydrophoben Resten, wie Leucin und Phenylalanin [BRENDA 2010].

Trotz der aufgeklärten Struktur von TLN [Matthews et al. 1972] ist der genaue Reaktionsmechanismus noch in der Diskussion. In Abbildung 13 ist ein möglicher Reaktionszyklus von TLN dargestellt. Das Zink-Ion ist an das Enzym durch drei Liganden (His142, His146, Glu166) gebunden. An das Metall-Ion bindet ein Wassermolekül. Die genaue Position des Wassers ist für den Ablauf der entsprechenden katalytischen Reaktion signifikant. Für die Katalyse spielen Glutaminsäure (Glu143), Histidin (His231), Asparaginsäure (Asp226) und Tyrosin (Tyr157) bedeutende Rollen (Abb. 13 A).

Der Sauerstoff der Carbonylgruppe des Substrates lagert sich zwischen His231, Tyr157 und dem Wassermolekül in der Nähe des Zink-Ions an (Abb. 13 B).

Das C-Atom der Carbonylgruppe wird nukleophil durch den Sauerstoff des Wassermoleküls angegriffen. Dieser Effekt wird durch den gegenseitigen Einfluss von Glu143 und dem Metall-Ion verstärkt. Glu143 vermittelt ein Wasserstoffproton (Wassermolekül) zum Stickstoff, wodurch ein tetraedrisches Zwischenprodukt entsteht. Des Weiteren hilft die positive Ladung von His231 (unter Einfluss von Asp226) die Katalyse zu stabilisieren (Carbonylsauerstoff). Die C-N Bindung wird gelöst und das Peptidspaltstück des Substrates mit Aminogruppe wird abgespalten. Dabei nimmt der Stickstoff der Aminogruppe das zweite Proton (H^+) des Wassermoleküls auf, welches wiederum durch Glu143 vermittelt wird (Abb. 13 C).

Durch Einlagerung eines neuen Wassermoleküls wird das Peptid gespalten und das Enzym regeneriert (Abb. 13 D) [Pelmenschikov et al. 2002].

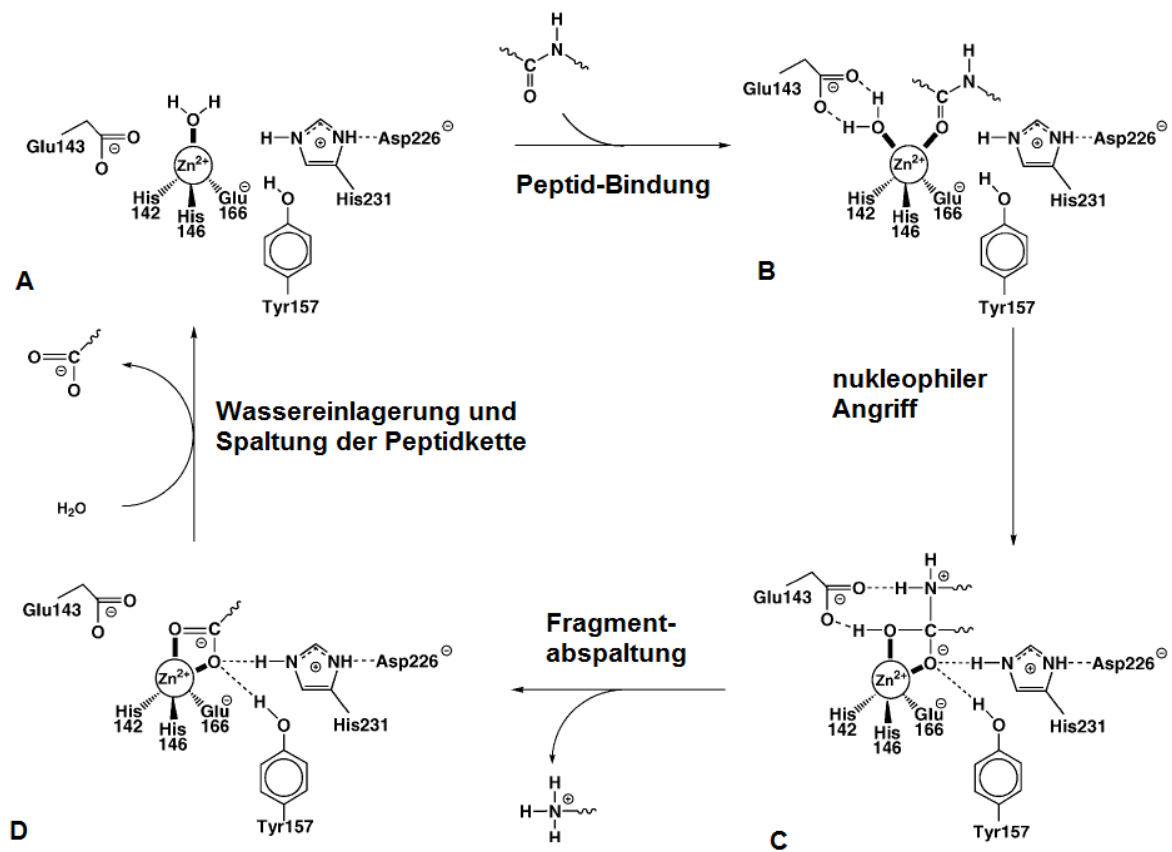


Abbildung 13: Experimentell unterstützter Reaktionszyklus von TLN. A: TLN (aktive Struktur) mit dem vermittelten Zink-Ion. B: Enzym-Substrat-Komplex. C: Tetraedrisches Zwischenprodukt. D: Enzym-Carboxylat-Komplex [Hangauer et al. 1984; Matthews 1988]

2.4 Analyse der Kollagenfragmente

In der Analytik gibt es zahlreiche Analysenmethoden. Neben den klassischen Methoden, wie Gravimetrie und Titrationsen, kommen hauptsächlich instrumentelle Methoden zum Einsatz. Man unterteilt diese allgemein in spektroskopische und elektroanalytische Methoden sowie in chromatografische und elektrophoretische Trennmethode. In dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Kollagenfragmente mit Hilfe von elektrophoretischen Trennmethode.

2.4.1 Die Elektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass geladene Teilchen unter dem Einfluss eines Gleichstromfeldes wandern. Die Teilchen bewegen sich aufgrund ihrer verschiedenen Ladungen, Massen und hydrodynamischen Radien mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (Mobilitäten). Die einzelnen Fraktionen können nach definierter Elektrophorese-Trennzeit an verschiedenen Stellen eines Trägers nachgewiesen werden [Naumer und Heller 1997].

Bei Anlegen eines Gleichstromfeldes wirkt auf die Ladung (q) des Analyten eine beschleunigende Kraft (F_B), die abhängig von der elektrischen Feldstärke (E) ist (Gleichung 1). Dabei ist z_i die Ladungszahl und e die Elementarladung.

$$F_B = q \cdot E = z_i \cdot e \cdot E$$

Gleichung 1: Beschleunigende Kraft

Die Reibungskraft (F_R), die während der Wanderung des Analyten durch den Träger entsteht, wirkt der Bewegung entgegen. Sie ist direkt proportional zu dem Reibungskoeffizienten (k_R) und der Wanderungsgeschwindigkeit (v_i) des Analyten (Gleichung 2). Der Reibungskoeffizient (k_R) wiederum ist von der Viskosität des Trägermediums abhängig und wird weiterhin durch dessen Porensystem und Porengröße bestimmt.

$$F_R = k_R \cdot v_i$$

Gleichung 2: Reibungskraft

Im Gleichgewichtszustand ($F_B = F_R$) bewegen sich die Ionen im elektrischen Feld mit konstanten Geschwindigkeiten (Gleichung 3). Die Mobilität bzw. die elektrophoretische Beweglichkeit (u_i) stellt dabei den Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und elektrischer Feldstärke dar.

$$v_i = \frac{q \cdot E}{k_R} = u_i \cdot E$$

Gleichung 3: Wanderungsgeschwindigkeit

Werden die Ionen als Kugeln betrachtet, kann das Stokes'sche Gesetz ($F_R = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot v_i \cdot \eta$) angewandt werden. In die Stokes'sche Reibungskraft geht die Viskosität (η) des Trägermediums sowie der Radius (r_i) des hydratisierten Ions mit ein. Die sich daraus ergebende Mobilität ist in Gleichung 4 dargestellt.

$$u_i = \frac{q}{k_R} = \frac{z_i \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta}$$

Gleichung 4: Mobilität kugelförmiger Analyten

Bei dem Wanderungsprozess entsteht Wärme, welche in der Regel während der Elektrophorese abgeführt wird (Gleichung 5). Sie ist direkt proportional zur elektrischen Feldstärke, der Äquivalenzleitfähigkeit (λ) und der molaren Konzentration (c) des Elektrolyten.

$$W = E^2 \cdot \lambda \cdot c$$

Gleichung 5: Joule'sche Wärme

Die Beweglichkeit der Teilchen hängt stark davon ab, wie gut sie im Träger dissoziieren. Da die zu untersuchenden Analyten meist einen unterschiedlichen Dissoziationsgrad aufweisen, werden die elektrophoretischen Trennungen in Pufferlösungen durchgeführt.

2.4.2 Das Polyacrylamid-Gel

Wird als Träger ein Gel eingesetzt, spricht man von Gelelektrophorese (GE). Diesbezüglich werden primär Polyacrylamid-Gele (PAG) verwendet. Das Polyacrylamid (PA) hat den Vorteil chemisch inert zu sein und dadurch nicht in Wechselwirkung mit den Ionen zu treten. Ebenso besitzt es keine elektrische Ladung, die die Bewegung der Probe behindert. Durch das PAG entsteht ein Siebeffekt, wodurch eine Trennung nach Größen bzw. Molmassen erfolgt. Kleine Proteine wandern besser durch die Maschen als große [Naumer und Heller 1997].

PA entsteht durch Polymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid (Abb. 14). Dabei wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalspender und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator eingesetzt [Gey 2008].

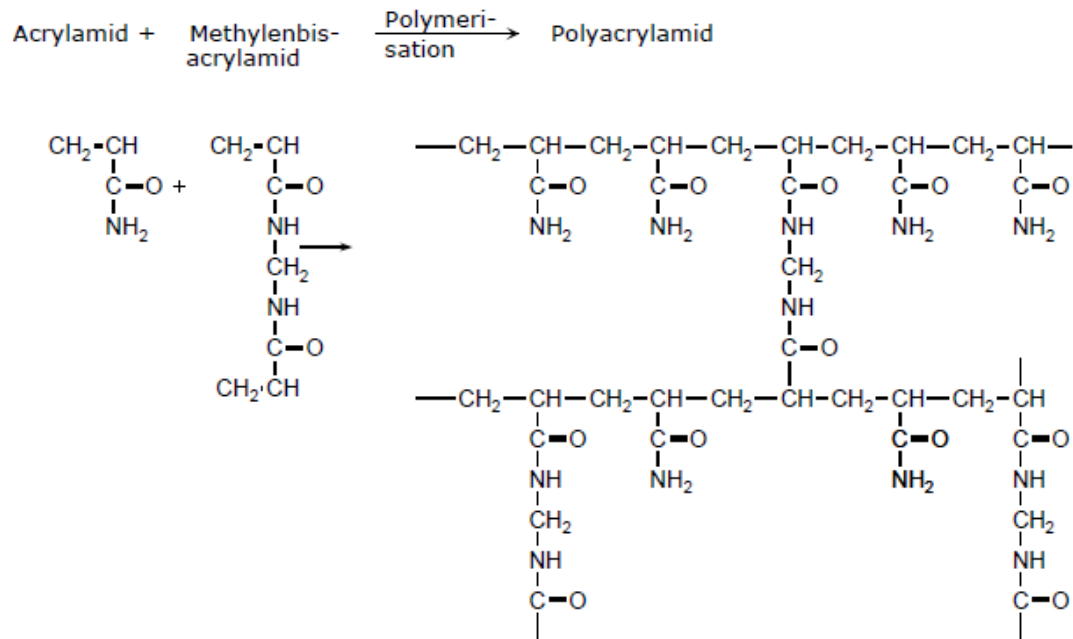


Abbildung 14: Polymerisation von Polyacrylamid [Gey, 2008]

Durch die jeweilige Menge dieser Komponenten wird die Porengröße des Gels bestimmt. Dabei stellen die prozentualen Angaben der Totalacrylamidkonzentration T und des Vernetzungsgrades C wichtige Parameter dar (Gleichung 6).

$$T = \frac{(x + y) \cdot 100}{V} [\%] \quad C = \frac{y \cdot 100}{x + y} [\%]$$

Gleichung 6: Berechnung der Totalacrylamidkonzentration und des Vernetzungsgrades [Häder und Häder 1993]

Die Variable x steht für die Menge an Acrylamid und y entspricht der Methylenbisacrylamidmenge. Weiterhin geht für T das Gesamtvolumen V der Mischung mit ein. Durch Erhöhung von T bei konstantem C sinkt die Porengröße. Bei konstantem T und niedrigen bzw. hohen C -Werten entsteht dagegen ein großporiges Gel [Häder und Häder 1993].

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese besteht die Gelmatrix aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel im oberen Bereich ist weitporig und das eigentliche Trenngel engporig. Aufgrund eines weitporigen Sammelgels können Proteine sehr schnell wandern. Es entstehen Proteinzonen hoher Konzentration und niedriger Schichtdicke. Diese geringe Schichtdicke ist ein entscheidender Vorteil für die Trennschärfe (Kapitel 2.4.3, zweite Dimension) [Hallbach 2006].

2.4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) trennt Proteine in einem Probengemisch durch die Kombination zweier analytischer Methoden. Im ersten Schritt werden die Proteine bzw. Peptide nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) fokussiert, um dann anschließend nach ihrer Molekülgröße (Molmasse) weiter aufgetrennt zu werden. Dadurch ist die 2D-GE eine sehr hochauflösende Methode. Es entstehen Peptidkarten (peptide maps), in denen sehr viele Peptide qualitativ und mit densitometrischen Auswertungen quantitativ charakterisiert werden können.

Die Idee, Proteine in zwei Dimensionen aufzutrennen, entstand in den 50er Jahren. Diesbezüglich wurden u. a. die Papier- und Stärkegel-Elektrophorese miteinander kombiniert bzw. die Agargel- und Immuno-Elektrophorese [Rehm 2006]. Durch *Kaltschmidt und Wittmann* (1970) bzw. *Kenrick und Margolis* (1970) wurde erstmals ein zweidimensionales PAG-System entwickelt, in dem die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kombiniert wird. Die Anwendung dieser Methode erstreckte sich jedoch nur auf die Reinigung einzelner Proteine oder Proteinkomplexe (Ribosomen, Serumproteine). Der Gedanke die 2D-GE zu nutzen, um die gesamten Proteine in einer Zelle (Proteom) darzustellen, wurde von *Klose und O'Farrell* (1975) aufgegriffen. Dabei trennte *Klose* das Proteom der Maus [Klose 1975] und *O'Farrell* das Proteom von *Escherichia coli* auf [O'Farrell 1975]. Mit der Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) [Bjellqvist et al. 1982] wurde die Methode verbessert und damit reproduzierbarer [Corbett et al. 1994].

Die erste Dimension (IEF)

In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung des Probengemisches nach dem pI-Wert. Aufgrund ihres amphoteren Charakters eignen sich Proteine bzw. Peptide besonders gut, um isoelektrisch fokussiert zu werden. AS liegen in wässrigen Lösungen als Ionen vor, die einerseits durch die Aminogruppe (Stickstoff) als Base wirken, andererseits durch die Carboxylgruppe (Sauerstoff) als Säure wirken. Die jeweiligen Ladungsverhältnisse sind abhängig vom pH-Wert der Lösung. Bei niedrigem pH-Wert besitzt die AS eine positive Ladung. Mit steigendem pH-Wert kommt es zunehmend zur Dissoziation von Wasserstoff, was zu einer negativen Ladung führt. Der pI-Wert ist der Wert, an dem sich die positive Ladung der Aminogruppe und die negative Ladung der Carboxylgruppe aufheben. Dieser ist für jede AS charakteristisch. Überwiegen beispielsweise AS mit negativen Ladungen, ergibt sich für das Protein eine nach außen gerichtete negative Nettoladung. In Abbildung 15 ist beispielhaft eine Kurve dargestellt, die sich durch das Auftragen der Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert ergeben kann.

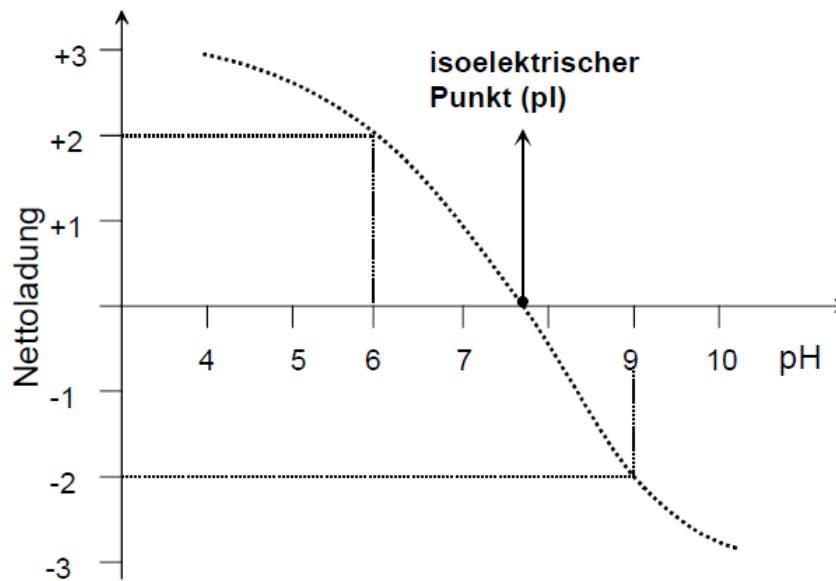


Abbildung 15: Abhängigkeit der Nettoladung eines Proteins vom pH-Wert. Am isoelektrischen Punkt heben sich die positive Ladung der Aminogruppe und die negative Ladung der Carboxylgruppe auf [Gey 2008].

Zur Durchführung einer IEF, wird in das PAG ein pH-Gradient etabliert. Die Proteine einer Proteinmischung besitzen nach dem Auftrag an einer Stelle innerhalb des pH-Gradienten eine unterschiedliche Nettoladung. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Ampholyte bis zu dem pH-Wert, der ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt entspricht. Am pI heben sich die gegenseitigen Ladungen der AS auf, so dass die Nettoladung des Proteins null ist. Da sich nur geladene Teilchen im elektrischen Feld bewegen, sind die Proteine an dieser Stelle fokussiert [Naumer und Heller 1997].

Die IEF kann zum einen mit Trägerampholyten, zum anderen mit IPG durchgeführt werden. Trägerampholyte setzen sich aus verschiedenen Polyaminocarbonsäuren zusammen. Die Trägerampholyte sind nach dem Auftragen auf die Gelmatrix ungeordnet. Durch ein elektrisches Feld beginnen diese zu wandern. Ampholyte mit niedrigem pI-Wert (negative Nettoladung) wandern zur Anode bzw. solche mit hohem pI-Wert (positive Nettoladung) zur Kathode. Die restlichen positionieren sich dazwischen, wodurch ein kontinuierlicher pH-Gradient entsteht [Westermeier 1990]. Fokussierungen mit Trägerampholyten haben den Nachteil der Kathodendrift, d.h. die langsame Verschiebung und Verformung des Gradienten [Michov 1995]. Weiterhin ist die Reproduzierbarkeit eingeschränkt.

Hingegen wird die IEF durch IPG reproduzierbar und kann als ein routinemäßiges Verfahren eingesetzt werden. Bei den IPG werden pH-bestimmende Substanzen (Immobiline) kovalent an das PA gebunden. Diese Substanzen sind niedermolekulare Acrylamid-Derivate, die puffernde Gruppen tragen und deren Methylengruppe an der Copolymerisation von

Acrylamid und Methylenebisacrylamid teilnimmt. Die Verteilung der Immobiline erfolgt beim Gießen des Gels. Eine mögliche Kathodendrift kann damit verhindert werden. Die Herstellung der IPG-Gele erfolgt mit einem Gradientenmischer [Michov 1995]. Abbildung 16 zeigt einen gebräuchlichen IPG-Streifen.

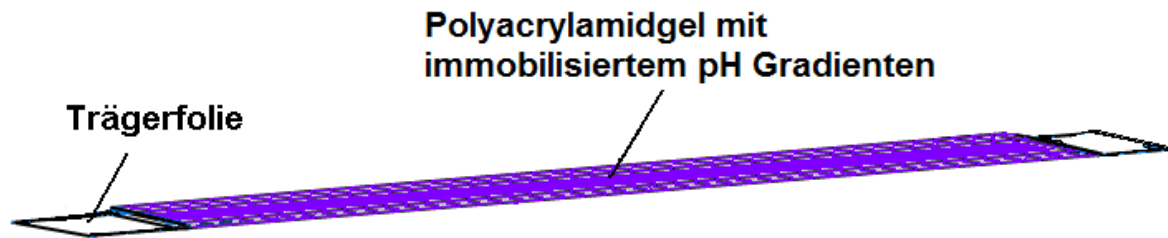


Abbildung 16: Aufbau eines IPG-Streifens. Oft enthält das Gel Spuren von Bromphenolblau um den Verlauf der Fokussierung zu verfolgen.

Die IEF ist eine hoch auflösende Methode, d.h. die erreichbare Trennung zweier Proteine mit ähnlichem pI-Wert ist sehr gut. Die SVENSSON Gleichung (Gleichung 7) liefert diesbezüglich einen Zusammenhang [Righetti 1983].

$$\Delta pI = \sqrt{\frac{D \cdot \left(\frac{d(pH)}{dx} \right)}{E \cdot \left(-\frac{du_i}{d(pH)} \right)}}$$

Gleichung 7: SVENSSON-Gleichung [Svensson 1961]

ΔpI	Auflösungsvermögen
D	Diffusions-Koeffizient des Proteins
E	elektrische Feldstärke
$\frac{du_i}{d(pH)}$	Mobilitätssteigerung des Proteins am pI
$\frac{d(pH)}{dx}$	pH-Gradient

Für die Ausbildung schmaler Proteinbanden ist eine hohe elektrische Feldstärke erforderlich. Die Steigerung der Mobilität eines Proteins am pI ist nicht beeinflussbar. Durch sehr flache pH-Gradienten und durch engporige Gelmedien bei hohen Diffusions-Koeffizienten kann eine Erhöhung der Auflösung erreicht werden [Westermeier 1990].

Neben der gewählten Gleichspannung ist die optimale Fokussierzeit entscheidend für die Qualität der zu erstellenden Peptidkaten. Die Fokussierzeit wird durch die Probenmenge bzw. der Art der Probe (sauer, basisch), der Anwesenden Detergenzien und dem pH-Gradienten bestimmt. Weiterhin hängt diese von der Weglänge (pH-Gradient) der Trennung ab sowie von der Lage des Probenauftrags im IPG. Eine mögliche minimale Fokussierzeit kann aus dem Strom-Spannungsdiagramm im stationären Zustand (steady state) entnommen werden [Görg et al. 1988].

Die zweite Dimension (SDS-PAGE)

Nachdem die Proteine isoelektrisch fokussiert sind, erfolgt die Trennung nach der Molekülgröße (Molmasse) durch eine SDS-PAGE (Abb. 17).

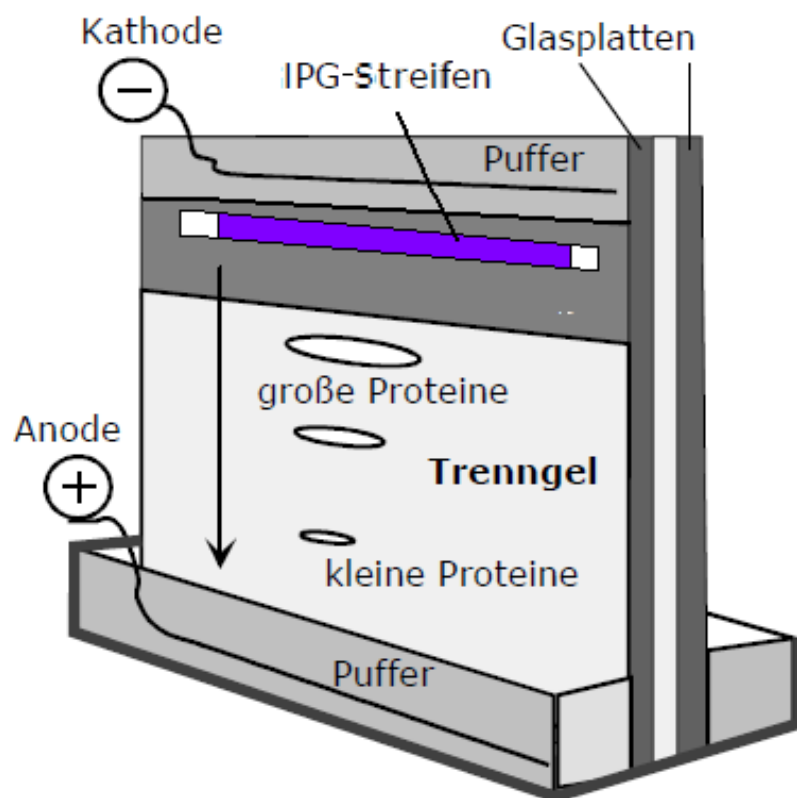


Abbildung 17: Apparative Anordnung der SDS-PAGE (2D-GE)

Nach der IEF wird der IPG-Streifen für die zweite Dimension äquilibriert. Dazu wird ein SDS-Puffer benutzt. SDS ist ein anionisches Tensid (Abb. 18), welches die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dabei binden pro 1 g Protein ca. 1,4 g SDS [Gey 2008].

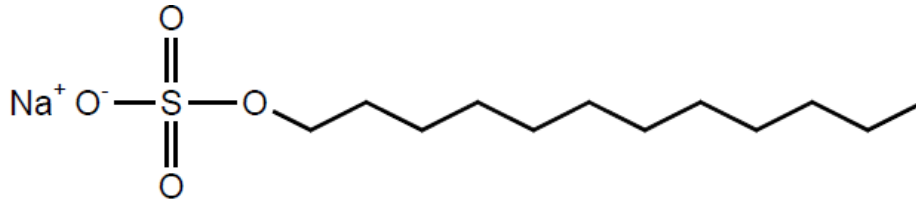


Abbildung 18: SDS-Struktur mit einer polaren und einer unpolaren Gruppe

Die denaturierten Proteine besitzen aufgrund der Mizellenbildung eine einheitliche Molekülform und sind stark negativ geladen. Aus diesem Grund hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Peptide während der GE nur noch von der Molekülgröße bzw. Molmasse ab.

Nach der Äquilibration wird der IPG-Streifen auf ein PAG aufgebracht und die Trennung nach der Molekülgröße (Molmasse) beginnt. Hierbei kommt ein Tris-Glycin Puffersystem zum Einsatz [Laemmli 1970]. Dieses besteht u.a. aus Folge-Ionen (Glycin) im Laufpuffer und aus Leit-Ionen (Cl^-) im Gel. Nach dem Anlegen des elektrischen Feldes wandern die Ionen im Sammelgel mit gleicher Geschwindigkeit in gleichförmig konzentrierten, unmittelbar hintereinanderfolgenden Zonen bzw. Blöcken. Dieser Vorgang wird als Isotachophorese bezeichnet [Naumer und Heller 1997]. Die Chlorid-Ionen (Cl^-) besitzen im Vergleich zu den anderen Ionen eine hohe Mobilität. Da die Elektrophorese mit konstantem Strom abläuft, folgt aufgrund der unterschiedlichen Mobilitäten, dass auf die einzelnen getrennten Ionen zonen unterschiedliche elektrische Feldstärken einwirken. Innerhalb des Bereiches der Leit-Ionen stellt sich eine niedrige elektrische Feldstärke ein bzw. eine hohe im Bereich der Folge-Ionen. Die Mobilität der negativ geladenen SDS-Mizellen liegt zwischen Leit- und Folge-Ionen. Diese bewegen sich in dem gebildeten Feldstärkegradient, wobei die Protein-Ionen mit hohen Mobilitäten den Chlorid-Ionen folgen bzw. die Ionen mit den geringsten Mobilitäten von den Folge-Ionen geschoben werden [Walker 2002]. Bei der 2D-GE übernimmt das PAG des IPG-Streifens sowie die zur Fixierung des Streifens verwendete Agarose die Funktion des Sammelgels [Rehm 2006].

An der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel bildet sich aufgrund der höheren Porendichte des Trenngels und dem damit verbundenen erhöhten Reibungswiderstand ein Stau der einzelnen Zonen. Dabei kommt es zu einer Verengung der Zonen, wodurch eine bessere Auflösung erreicht wird. Glycin als kleines Molekül ist davon nicht betroffen und überholt die zu trennenden Proteine [Westermeier 1990]. Im engporigen Trenngel erfolgt die Auftrennung der SDS-Mizellen (Peptide) nur von der Molekülgröße (Molmasse) durch einen Siebeffekt.

Im 2D-Gel erscheinen die Proteine nach der Anfärbung nicht in einem scharf umrandeten Flecken (Spot), sondern zeigen in ihrer Farbintensität eine Gauss-Verteilung (Abb. 19). Daher können die Gauss-Schwänze der Proteine hoher Konzentration die Spots von Proteinen niedriger Konzentration verdecken [Rehm 2006].

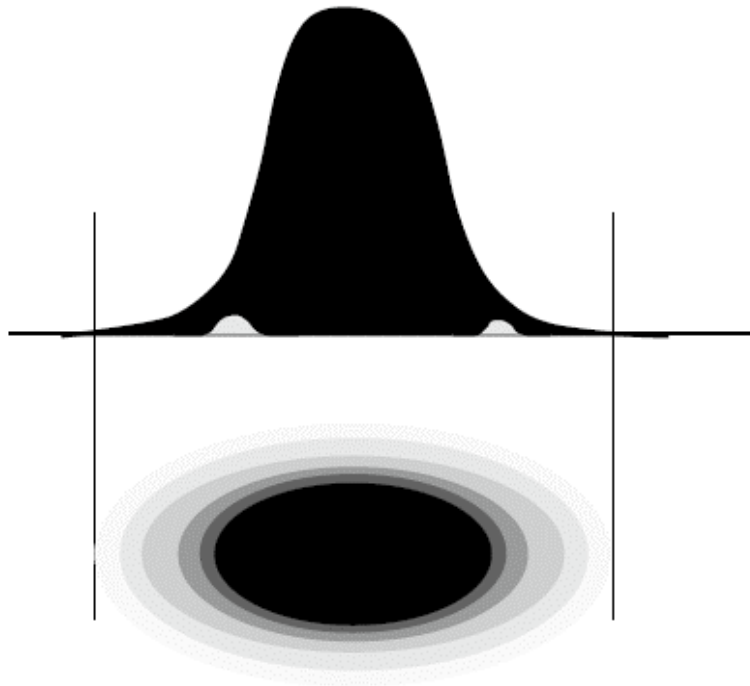


Abbildung 19: Deckproblem im 2D-Gel. Die Spots sind nach einer Gauss-Kurve verteilt [Rehm 2006].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Tab. 8), Enzyme (Tab. 9) und Verbrauchsmaterialien (Tab. 10) aufgeführt.

Tabelle 8: Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Roth
Ameisensäure	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth
Ampholyte (pH 3-10, 4-7, 6-10)	Serva
BrCN-Lösung (5 M Acetonitril)	Merck
Bromphenolblau	Chemapol
Calciumchlorid	Roth
<i>Densi Stain Blue G (2x)</i>	Serva
Destilliertes Wasser	Destillation im Institut
EDTA	US Biological
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Serva
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhypochloritlösung	Roth
Natriumthiosulfat	Riedel-de Haën
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Salzsäure	Roth
SDS	Serva
Silbernitrat	VEB Laborchemie Apolda
Silikonöl	Serva
Tris (Trizma base)	Sigma

Tabelle 9: Enzyme

Enzym	EC-Nr.	Hersteller	Organismus	U/mg	M _r [kDa]
α-Chymotrypsin	3.4.21.1	Sigma	Rinderpankreas	50	25,0
Kollagenase IA	3.4.24.3	Sigma	<i>Clostridium histolyticum</i>	469	91,0 ¹
TLN	3.4.24.27	Sigma	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	64	34,6

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
HiTrap-Säule	GE Healthcare
SERVAGel™ Neutral pH 7.4	Serva
SERVAGel™ TG 8	Serva
SERVAGel™ TG 12	Serva
SERVAGel™ TG 12 für 2D	Serva
SERVAGel™ TG 14 für 2D	Serva
SERVAGel™ TG 8-16 für 2D	Serva
SERVA IPG BlueStrips 3-10 NL/ 7 cm	Serva
SERVA IPG BlueStrips 3-10/ 7 cm	Serva
SERVA IPG BlueStrips 4-7/ 7cm	Serva
SERVA IPG BlueStrips 6-10/ 7 cm	Serva
Test Mixture für pI Determination (pH 3-10)	Serva
SDS-PAGE Protein Standard	Serva

Als Untersuchungssubstanz diente SLK vom Rind (Haut). Die Herstellung erfolgte im Institut. Weiterhin wurden ein boviner Kollagenstandard vom Typ I (Sigma-Aldrich) sowie ein boviner Kollagenstandard vom Typ III (MILLIPORE) verwendet.

3.2 Geräte

Analysenwaage/ Präzisionswaage	Sartorius
Analysenwaage XP205 Delta Range	Mettler Toledo
Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 2.5	vacuubrand
Einkanalpipetten	Eppendorf
Elektrolysekammer Blue Vertikal 102	Serva
Gefriertrockner ALPHA 1-2	CHRIST
Geldokumentationsanlage INGENIUS	SYNGENE
IEF 100	Hoefer

¹ Lwebuga-Mukasa et al. 1976

pH Meter HI 221	Hanna Instruments
Rührwerk R3T	MLW
Schüttelbad SW-20C	Julabo
Spannungsquelle DESATRONIC 6000/100	DESAGA
Thermoblock MBT 250	ETG
Thermoblock SBH 130D	stuart
Trockenschrank kelvitron® t	Heraeus
Vakuumpumpe MZ 2C	vacuubrand
Vakuumzentrifuge RVC 2-18	CHRIST
Vortex Mixer VM-300	Gemmy Industrial Corp.
Zentrifuge Universal 32 R	HETTICH

3.3 Methoden

3.3.1 Bromcyan-Spaltung

Lösungen

Ameisensäure	70 %(v/v)
BrCN-Lösung	5 M in Acetonitril
Essigsäure	0,1 M
Natriumhypochloritlösung	12 % Chlor

In ein 2 ml Hydrolysegefäß (Eppendorf) wurden 5 mg gefriergetrocknete Probe eingewogen und mit 700 µl Ameisensäure sowie 14 µl BrCN-Lösung versetzt. Anschließend erfolgte das Inkubieren der Ansätze bei 30°C für 4 Stunden im Thermoblock. Durch Zugabe von 500 µl destilliertem Wasser wurde die Inkubation zum Abschluss gebracht. Danach wurde die Probe bei 14 000 rpm und 10°C für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1,5 ml gebracht.

Die Abtrennung des überschüssigen BrCN erfolgte mit Hilfe einer HiTrap-Säule. Die Säule wurde mit 20 ml filtrierter Essigsäure konditioniert. Danach wurde die ebenfalls filtrierte Probe mit dem gesamten Volumen aufgetragen, mit weiterer Essigsäure von der Säule gespült und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Das sich noch auf der Säule befindliche BrCN wurde beim Nachspülen direkt in Hypochloritlösung eingeleitet. Anschließend wurde die Probe bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Enzymatische Spaltung

Lösungen

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung	0,2 M
Tris-Essigsäure-Puffer (pH 7,5)	0,1 M
Enzymlösung (α -Chymotrypsin, Kollagenase, TLN)	20 U
CaCl ₂ -Lösung	0,05 M
Inhibitorcocktail	

Bei dem Inhibitorcocktail handelt es sich um einen Mix verschiedener Protease-Hemmer:

AEBSF:	Serin-Proteasen
Aprotinin:	Serin-Proteasen
Bestatin-Hydrochlorid:	Aminopeptidasen
E-64:	Cystein-Proteasen
EDTA:	Metallo-Proteasen
Leupeptin Hemisulfatsalz:	Serin- und Cystein-Proteasen

SLK:

Für die enzymatische Spaltung wurden jeweils 25 mg SLK in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Zu der Probe wurden 800 μ l einer frisch angesetzten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und gut durchmischt. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach den unterschiedlichen Varianten.

Variante A: Proben 15 Minuten bei 85°C denaturieren

Variante B: Proben nicht denaturieren

Bei Variante A wurde die Probe für 15 Minuten bei 85°C im Thermoblock denaturiert und zur Abkühlung bei RT stehen gelassen. Proben der Variante B wurden ohne Erhitzung weiterbehandelt.

In die Probenlösung wurden anschließend 100 μ l destilliertes Wasser bzw. 100 μ l 0,05 M CaCl₂-Lösung zugegeben und gut durchmischt. Die Zugabe der CaCl₂-Lösung erfolgte bei der enzymatischen Spaltung mit Kollagenase, da diese Ca-Ionen für die katalytische Aktivität benötigt. Danach wurden 100 μ l der Enzymlösung in die Probe gegeben und gut durchmischt. Die Reaktion fand bei 37°C im Thermoblock unter Variation der Inkubationszeiten statt. Diesbezüglich fanden Inkubationszeiten von 2, 4, 6 und 8 Stunden statt sowie über Nacht. Nachdem die jeweilige Reaktionszeit erreicht wurde, erfolgte die

Zugabe von 100 µl des Inhibitorcocktails. Anschließend wurde die Probe bei -20 °C eingefroren.

Kollagenstandards (kommerzielle Standards)

Für die enzymatische Spaltung wurden jeweils 1 mg Kollagenstandard in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Zu der Probe wurden 800 µl einer frisch angesetzten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden in die Probenlösung 100 µl destilliertes Wasser bzw. 100 µl 0,05 M CaCl₂-Lösung zugegeben sowie 100 µl Enzymlösung (20 U). Nach vierstündiger Reaktionszeit wurden in die Lösung 100 µl des Inhibitorcocktails zugegeben.

3.3.3 Bestimmung des Abbaugrades

Lösungen

Tris-Essigsäure-Puffer (pH 7,5)	0,1 M
Enzymlösung (α-Chymotrypsin, Kollagenase, TLN)	20 U
CaCl ₂ -Lösung	0,05 M
Inhibitorcocktail	

Für die Bestimmung des Abbaugrades wurde ein Tris-Essigsäure-Puffer verwendet. Die Einwaagen sowie die Pipettierungen der Lösungen erfolgten wie in Kapitel 3.3.2 (SLK) beschrieben. Die Inkubationszeiten lagen bei 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden. Nach dem Reaktionsstopp wurden die Proben bei 14 000 rpm und 20 °C für 7 Minuten abzentrifugiert sowie der klare Überstand abpipettiert. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf ein einheitliches Volumen von 1,5 ml gebracht und mittels Vortexer gut durchmischt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der klare Überstand abpipettiert. Insgesamt erfolgten drei Waschgänge. Zur Trocknung wurden die Reaktionsgefäße über Nacht im Trockenschrank bei 103 °C getrocknet und am nächsten Tag ausgewogen. Die Berechnung des Abbaugrades erfolgte nach Gleichung 8.

$$\text{prozentualer Abbaugrad} = \frac{(\text{Einwaage} - \text{Auswaage})}{\text{Einwaage}} \cdot 100\% - \text{Blindwert}$$

Gleichung 8: Prozentualer Abbaugrad

Für eine genauere Fehlerbetrachtung wurde parallel eine Blindwert-Probe mitgeführt. Die Inkubation der Blindwert-Probe lag bei 4 Stunden. Diesbezüglich wurden 100 µl Enzymlösung durch 100 µl destilliertes Wasser ersetzt.

3.3.4 Isoelektrische Fokussierung

Rehydratisierungspuffer

Harnstoff	8 M
Ampholyte	0,5 %(v/v)

Der Harnstoff und die Ampholyte (passend zum pH-Bereich des IPG *BlueStrips*) wurden in destilliertem Wasser gelöst, in je 2 ml Reaktionsgefäß aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Bevor die Probe auf den IPG-Streifen (sample in-gel-Rehydratisierung) aufgetragen wurde, erfolgte eine Zentrifugation bei 14 000 rpm für 7 Minuten bei RT.

Für die IEF wurden SERVA IPG *BlueStrips* mit einer Länge von 7 cm verwendet. Die Proben wurden im Rehydratisierungspuffer gelöst und der Gelstreifen über Nacht bei RT in dieser Lösung inkubiert (sample in-gel-Rehydratisierung). Dazu wurden die Streifen mit der Gelseite nach unten an einer Seite in den Puffer eingetaucht und dieser luftblasenfrei über die gesamte Länge der Streifen verteilt, so dass das Gel gleichmäßig benetzt wurde. Pro Streifen wurde ein Volumen von 130 μl Lösung verwendet. Nach ca. 5-10 Minuten hatte der Gelstreifen den Puffer restlos aufgesogen und konnte mit 1-2 ml Siliconöl beschichtet werden, um die Austrocknung über Nacht zu verhindern.

Die Fokussierung erfolgte am nächsten Tag. Diesbezüglich wurden die rehydratisierten Streifen parallel mit der Gelseite nach oben in die Kammer der Fokussiereinheit gelegt. Die mit dem Pluspol gekennzeichneten Enden der Streifen wurden zur Anode ausgerichtet. Anschließend erfolgte das Auflegen der mit Leitungswasser benetzten Elektrodendochte an den Enden, worauf die Anode bzw. Kathode leicht angedrückt wurden. Danach wurden die Streifen mit Silikonöl beschichtet, um erneut eine Austrocknung während der Fokussierung zu vermeiden.

Fokussierbedingungen:

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Fokussierprogramme aufgeführt.

Protokoll 1

$U_{\text{max}} = 500 \text{ V}$	$I_{\text{max}} = 200 \text{ }\mu\text{A}$ pro Streifen	$P = 0,1 \text{ W}$	$T = 20^{\circ}\text{C}$
Stufen:			
1.	500 V	Gradient	30 Minuten
2.	500 V	konstant	150 Minuten
Gesamt:		$\sim 1370 \text{ Vh}$	

Protokoll 2

$U_{\max} = 3000 \text{ V}$ $I_{\max} = 200 \text{ } \mu\text{A}$ pro Streifen $P = 0,1 \text{ W}$ $T = 20^\circ\text{C}$

Stufen:

1.	250 V	Gradient	30 Minuten
2.	500 V	Gradient	30 Minuten
3.	750 V	Gradient	30 Minuten
4.	1500 V	konstant	75 Minuten
5.	3000 V	konstant	120 Minuten

Gesamt: ~6600 Vh

Protokoll 3

$U_{\max} = 6000 \text{ V}$ $I_{\max} = 500 \text{ } \mu\text{A}$ pro Streifen $P = 0,5 \text{ W}$ $T = 20^\circ\text{C}$

Stufen:

1.	500 V	Gradient	30 Minuten
2.	1000 V	Gradient	30 Minuten
3.	6000 V	Gradient	30 Minuten
4.	6000 V	konstant	120 Minuten
5.	1000 V	konstant	60 Minuten

Gesamt: ~11000 Vh

Nach beendeter Fokussierung wurden die Streifen direkt für die zweite Dimension äquilibriert (Kapitel 3.3.5) bzw. bei -20°C eingefroren.

3.3.5 SDS-PAGE

Auftragspuffer

Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	0,0625 M
Bromphenolblau	0,009 %(w/v)
SDS	2,5 %(w/v)
Glycerin	10 %(v/v)

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte beim Tris-Puffer mittels konzentrierter Salzsäure. Das Bromphenolblau wurde in 0,05 %(w/v) NaOH gelöst.

Äquilibrierungspuffer

Tris-HCl-Puffer (pH 8,8)	0,05 M
Harnstoff	6 M
Bromphenolblau	0,01 %(w/v)
SDS	2 %(w/v)
Glycerin	30 %(w/v)

Aliquote wurden bei -20 °C (max. drei Monate) eingefroren.

Laufpuffer (10x)

Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	0,5 %(w/v)

Der Laufpuffer wurde auf Vorrat hergestellt. Für die SDS-PAGE wurde dieser im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die SDS-PAGE erfolgte ausschließlich mit Fertiggelele der Firma Serva (SERVAGel™). Diese wurden entsprechend der Bedienungsanleitung in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Trennbereiche der Gele sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Trennbereiche der Gele

Acrylamidkonzentration T in %	Trennbereich in kDa
Neutrales Gel (pH 7,4)	6-200
8	40-250
12	20-200
14	10-100
8-16	10-250

Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom durchgeführt. Dazu wurde für die ersten 10-15 Minuten ein Strom von 15 mA gewählt und anschließend auf 20 mA erhöht. Weiterhin wurde die Spannung auf 500 V und die Leistung auf 10 W begrenzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kassette entnommen und je nach Färbeprotokoll (Kapitel 3.3.6) weiter behandelt.

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte entsprechend der Anleitung zu den SERVAGel™-Fertiggelele.

SDS-PAGE mit eindimensionalen (1D)-Gelen:

Zusammensetzung

Acrylamid-Konzentration (T) 8 %, 12 %

Quervernetzer-Konzentration (C) 2,6 %

Tris-Glycin Gel:

Sammelgel 4 % T, 2,6 % C

Gelpuffer-Sammelgel 125 mM Tris/HCl (pH 6,8)

Gelpuffer-Trenngel 375 mM Tris/HCl (pH 8,8)

Neutrales Gel:

Sammelgel 5 % T, 2,6 % C

Gelpuffer Neutralgelpuffer (pH 7,4)

Die SDS-PAGE mit 1D-Gelen wurde durchgeführt, um einen Überblick möglicher Spaltfragmente zu bekommen. Nach dem Einsetzen des Gels wurde die Kammer mit dem Laufpuffer befüllt und der Kamm gleichmäßig aus dem Gel gezogen, so dass die Probestaschen luftblasenfrei mit dem Puffer befüllt waren. Diese besitzen ein Fassungsvermögen von 35 µl.

Die Proben wurden mit dem Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in die Probestaschen aufgetragen und die Gelelektrophorese gestartet.

SDS PAGE mit zweidimensionalen (2D)-Gelen:

Zusammensetzung

Acrylamid-Konzentration (T) 12 %, 14 %, 8-16 %

Quervernetzer-Konzentration (C) 2,6 %

Gelpuffer 375 mM Tris/HCl (pH 8,8)

Bevor der fokussierte Streifen in ein 2D-Gel überführt werden konnten, musste dieser äquilibriert werden. Die Äquilibration erfolgte jeweils in einem festverschlossenen Plastikröhrchen entweder mit 5 ml Auftragspuffer oder mit 5 ml Äquilibrationpuffer unter leichtem schütteln auf einem Schüttler. Der Streifen wurde mit der Gelseite nach oben in das Röhrchen vorsichtig überführt und für 15 Minuten bei RT mit dem Puffer gut benetzt. Anschließend wurde der Streifen kurz in Laufpuffer getaucht. Mit Hilfe eines dünnen Spatels wurde der Streifen in die Geltasche geschoben und so ausgerichtet, dass dieser luftblasenfrei am Gel auflag. Danach wurde die Probestasche mit 0,5 %iger warmer Agaroselösung (in Laufpuffer) bis zum Rand aufgefüllt, so dass der Streifen fixiert wurde. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde der Laufpuffer in die Elektrolysekammer gefüllt.

Anschließend wurde die Kammer verschlossen und mit der Spannungsquelle verbunden sowie die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem der Bromphenolblaustreifen im unteren Gelbereich angelangt war. Anschließend erfolgte das Färben des Gels (Kapitel 3.3.6).

Für eine genauere Charakterisierung der Peptide im Gel wurden teilweise Massenstandards parallel zum IPG-Streifen mit aufgetragen. Diesbezüglich wurde der Streifen an den Enden gekürzt, indem die überstehende Trägerfolie weggeschnitten wurde. Neben dem Streifen wurde ein Probenkamm mit in die Proben tasche des 2D-Gels geschoben. Nachdem der Probenkamm und der IPG-Streifen auf dem Gel auflagen, wurde in die Proben tasche Agarose (0,5 % in Laufpuffer) gegossen. Nach Erstarren der Agarose erfolgte das Befüllen der Kammer mit Laufpuffer sowie das Entfernen des Probenkamms. In die Proben tasche wurde jeweils 5 µl Standard pipettiert und die Elektrophorese sofort gestartet. Als Standard wurden sowohl globuläre Proteine (SDS-PAGE Protein Standard) als auch Peptide (CB) aufgetragen.

3.3.6 Färbeprotokolle

Färbung mit *Densi Stain Blue G*

Konzentrat	kolloidales Coomassie Blue G
Entfärber	Wasser

Für die Färbung wurden 50 ml des Konzentrats mit 50 ml destilliertem Wasser verdünnt. Das Gel wurde unter leichtem schütteln für 30 Minuten gefärbt (keine Fixierung notwendig). Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und das Gel mit Wasser entfärbt. Der erste Waschgang erfolgte für 30 Minuten unter leichtem schütteln. Danach wurde das Wasser gewechselt und das Gel über Nacht stehen gelassen. Die Farbintensität konnte durch die Dauer der Entfärbung reguliert werden.

Neben 2D-Gelen wurden auch IPG-Streifen gefärbt. Dazu wurde der Streifen nach der Fokussierung in einem festverschlossenen Plastikröhrchen mit ca. 2 ml *Densi Stain Blue G* für 10 Minuten gefärbt. Danach wurde die Färbelösung verworfen. Anschließend wurde in das Plastikröhrchen ca. 5 ml destilliertes Wasser gefüllt, so dass der IPG-Streifen vollständig mit Wasser umgeben war. Unter leichtem schütteln erfolgte die Entfärbung nach Sicht.

Silberfärbung

Fixierer

Methanol	40 %(v/v)
Essigsäure	10 %(v/v)

Waschlösung

Ethanol	30 %(v/v)
---------	-----------

Natriumthiosulfat-Lösungen

Stammlösung	2 %(w/v)
Gebrauchslösung	0,02 %(w/v)

Silbernitrat-Lösung

Silbernitrat	0,2 %(w/v)
Formaldehyd	0,02 %(v/v)

Entwickler

Natriumcarbonat	6 %(w/v)
Formaldehyd	0,05 %(v/v)
Na ₂ S ₂ O ₃ -Stammlösung	0,02 %(w/v)

Stopplösung

EDTA	0,5 %(w/v)
------	------------

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von *Blum et al.* (1987) sowie mit EDTA als Stopplösung.

Das Gel wurde über Nacht in der Fixierlösung inkubiert, um eine Diffusion der Proteine während der sich anschließenden Behandlungsschritte zu unterbinden. Danach folgte ein dreimaliger Waschgang mit Ethanol für 20 Minuten unter leichtem schütteln. Zur Imprägnierung wurden die PAG für 1 Minute in der Thiosulfatgebrauchslösung inkubiert. Anschließend schlossen sich drei Waschgänge mit destilliertem Wasser für je 20 Sekunden an, um überschüssiges Thiosulfat zu entfernen.

Unter leichtem schütteln wurden die Gele für 25 Minuten mit der Silbernitrat-Lösung benetzt. Die Ag⁺-Ionen bilden dabei Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine [Rehm 2006]. Nach der Inkubation wurde erneut dreimal mit destilliertem Wasser für je 20 Sekunden gewaschen, um überschüssiges Silbernitrat zu entfernen. Abschließend wurden die Gele nach Sicht entwickelt. Durch Zugabe der Stopplösung wurde die Reaktion bei ausreichender Färbung unterbrochen. Das Fotografieren der Gele erfolgte unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung.

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel der Arbeit bestand darin, zu untersuchen inwieweit Kollagentypen und ihre spezifischen Fragmente zweidimensional aufgetrennt werden können und damit eine spätere Methode gegeben ist, diese zu identifizieren. Um eine Reproduzierbarkeit und dadurch eine spätere Etablierung der neuen Methode zu gewährleisten, wurden verschiedene Parameter getestet und innerhalb bestimmter Bereiche variiert.

Als erstes erfolgte die zweidimensionale Auftrennung von BrCN gespaltenem Kollagen, da diese Peptide bereits charakterisiert sind. Danach wurde enzymatisch gespaltenes Kollagen untersucht. Die Spaltungen, sowohl mit BrCN als auch durch spezielle Enzyme, erfolgten mit kommerziellen Kollagenstandards und selbst hergestelltem Kollagen (SLK). Es wurde anhand des spezifischen Peptidmusters der aus der Standardspaltung aufgetrennten Peptide kontrolliert, inwieweit eine Charakterisierung des hergestellten Kollagens hinsichtlich einzelner Kollagentypen möglich ist.

4.1 Vergleich Auftragspuffer-Äquilibrierungspuffer

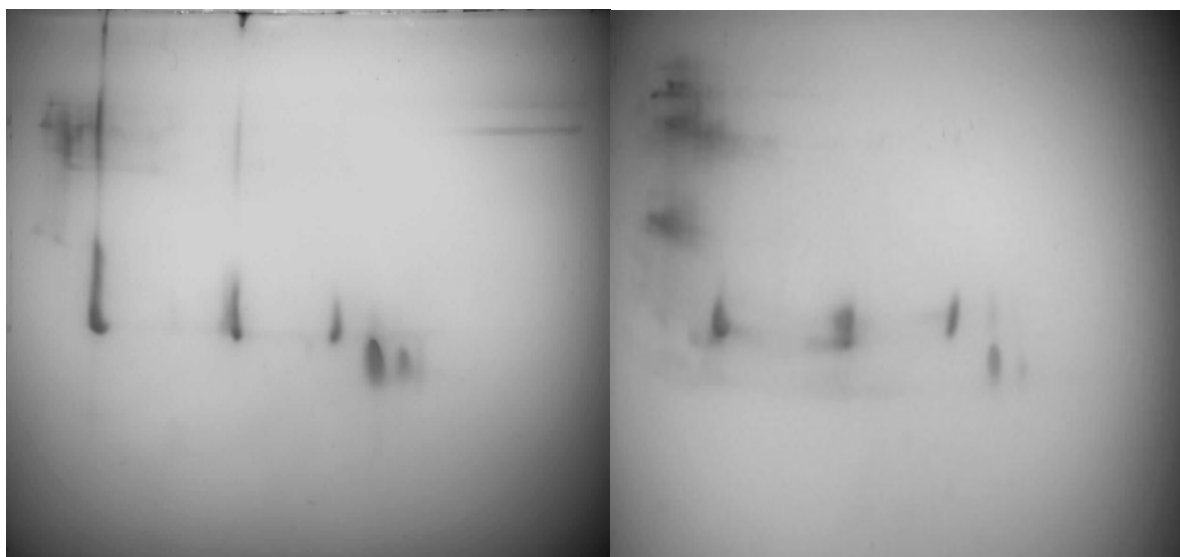
Ein großes Problem der Proteomik stellt der Probenpuffer dar. Die zweidimensionale Gelelektrophorese hat das Ziel, so viel wie möglich an unterschiedlichen Proteinen darzustellen. Aus diesem Grund muss der Probenpuffer in der Lage sein, viele Proteine zu lösen. Die Hauptkomponenten eines gebräuchlichen Probenpuffers für die 2D-Gelelektrophorese sind in Tabelle 12 dargestellt. Oft wird dem Harnstoff Thioharnstoff zusätzlich zugegeben, um beispielsweise Membranproteine zu denaturieren [Rehm 2006].

Tabelle 12: Zusammensetzung eines gebräuchlichen Probenpuffers für die 2D-Gelelektrophorese

Komponente	Funktion
Harnstoff	Proteine denaturieren
Reduzierende Reagenzien (DTT, Mercaptoethanol)	Disulfidbrücken aufbrechen
Alkylierungssubstanz (Iodacetamid)	Alkylierung von SH-Gruppen
Seife (Chaps, Triton-X-100)	Lösen von Membranproteinen

Als Untersuchungssubstanz wurde in dieser Arbeit SLK aus boviner Haut verwendet, welches überwiegend aus Kollagen vom Typ I und III zusammengesetzt ist. Eine Solubilisierung vieler Proteine war aus diesem Grund nicht notwendig. Deshalb wurden für die Rehydratisierung der IPG-Streifen überwiegend Harnstoff und Ampholyte verwendet. Da sich lediglich bei Typ III zwischen den Ketten Disulfidbrückenbindungen am C-Terminus der

Tripelhelix ausbilden und dieser nur einen geringen Teil des SLKs ausmacht [Ayad, Boot-Handford et al. 1998], wurde auf reduzierende und alkylierende Agenzien verzichtet. Die weitere Äquilibration der IPG-Streifen für die zweite Dimension erfolgte in dieser Arbeit entweder mit Auftragspuffer für die eindimensionale SDS-PAGE oder mit Äquilibrationpuffer (Kapitel 3.3.5). Ein Vergleich der Gelbilder nach Äquilibration in Äquilibrationpuffer bzw. Auftragspuffer ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Auftrennung erfolgte mit ca. 3500 Vh in der ersten Dimension, einem 2D-Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 14 % sowie mit IPG-Streifen von 3-10. Die Streifen wurden mit 40 µl des klaren Überstandes des mit BrCN gespaltenen SLK rehydratisiert. Es ist zu erkennen, dass bei der Äquilibration mit Auftragspuffer ein Verlaufen der Peptide nach unten hin festzustellen ist. Diese Schmierung könnte sich aufgrund einer zu hohen Konzentration ergeben. Weiterhin ist erkennbar, dass die Spots im Gel mit Auftragspuffer schärfer ausgebildet sind. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Bildern ist jedoch nicht erkennbar, so dass eine Äquilibration mit beiden Puffern möglich ist. Für die weiteren Versuche wurden die IPG-Streifen mit Auftragspuffer äquilibriert.



A

B

Abbildung 20: Vergleich von Äquilibrationpuffer und Auftragspuffer. A: Äquilibration fokussierter BrCN-Peptide (SLK) mit Auftragspuffer. B: Äquilibration fokussierter BrCN-Peptide (SLK) mit Äquilibrationpuffer

4.2 Isoelektrische Fokussierung

Bei der Auftrennung der Kollagenfragmente wurden verschiedene Fokussierbedingungen getestet. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte spannungsbegrenzend, d.h. die elektrische Stromstärke wird durch die festgelegte elektrische Spannung begrenzt. Diese wurde am Anfang im Gradientenmodus betrieben, wodurch die Spannung langsam erhöht wird. Die Fokussiereinheit erfasst die Kennwerte und speichert diese jede Minute ab, so dass es möglich wird für jeden IPG-Streifen ein Strom-Spannungsdiagramm zu erstellen. Mit dessen Hilfe kann ein erster Eindruck gewonnen werden, ob eine Fokussierung erfolgreich stattgefunden hat.

Kollagen-BrCN-Peptide

In Abbildung 21 ist das Strom-Spannungsdiagramm eines IPG-Streifens 6-10 dargestellt. Fokussiert wurde mit BrCN gespaltenem bovinen Kollagenstandard vom Typ III mit ca. 1370 Vh (Kapitel 3.3.4, Protokoll 1). Diese Voltstundenzahl erwies sich für die BrCN-Kollagenfragmente als vorteilhaft (nähere Erläuterungen in Kapitel 4.3.1). Die Diagramme zeigten bei allen Streifen mit einem pH-Gradienten von 6-10, welche nach Protokoll 1 fokussiert wurden, einen ähnlichen Kurvenverlauf.

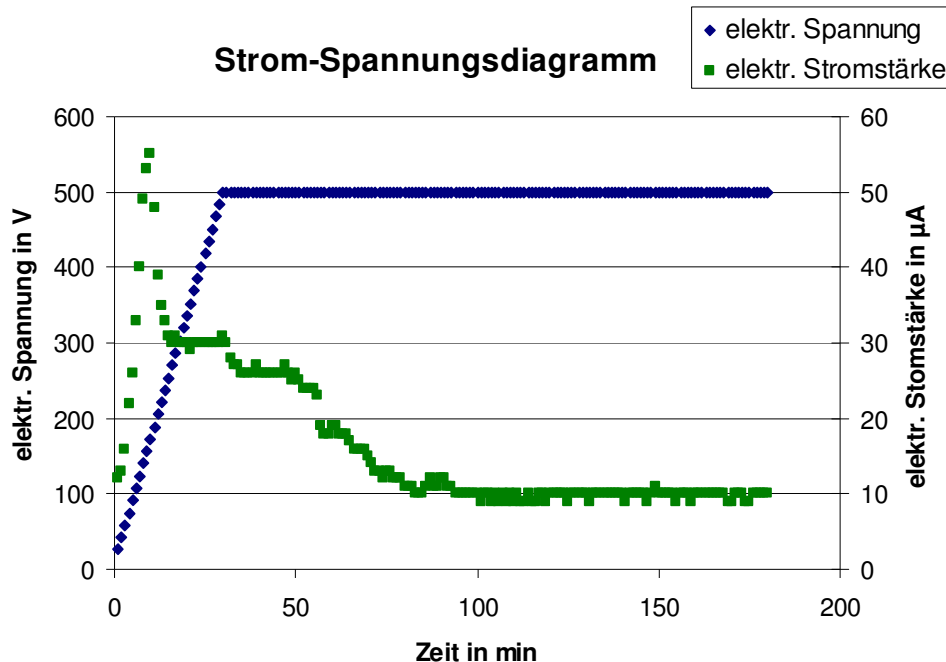


Abbildung 21: Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 1: 1370 Vh): Fokussierung von BrCN-Peptiden (Kollagenstandard Typ III) mit IPG-Streifen von 6-10

In den ersten Fokussierminuten ist ein signifikanter Verlauf erkennbar, welcher vermutlich auf die anfängliche Orientierung und Bewegung der Peptide im Gel zurückzuführen ist. Mit

steigender Voltzahl (bis 500 V) steigt ebenfalls die elektrische Stromstärke bis ein Maximum (55 μA) erreicht wird. Danach fällt die Stromstärke bis zu einem konstanten Wert ($\sim 30 \mu\text{A}$) ab. Mit fortlaufender Zeit und konstanter Spannung wird ein stufenartiger Abfall der Stromstärke beobachtet. Ab der 100. Minute pendelt sich die Stromstärke auf einen konstanten Wert um die 10 μA ein (steady state).

Enzymatisch gespaltene Kollagenhydrolysefragmente

Die enzymatisch gespaltenen Kollagenproben wurden überwiegend mit ca. 6600 Vh fokussiert (Kapitel 3.3.4, Protokoll 2). In Abbildung 22 ist das Strom-Spannungsdiagramm der Fokussierung von SLK, das durch TLN bei 4 Stunden und 37°C gespalten wurde, dargestellt. Verwendet wurden für die erste Dimension IPG-Streifen von 3-10. Diesbezüglich zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf, wie in Abbildung 22 dargestellt, auch bei durch Kollagenase und α -Chymotrypsin gespaltenem SLK. Fokussiert wurde jeweils nach Protokoll 2 mit IPG-Streifen von 3-10.

Analog zu Abbildung 21 steigt auch in diesem Fall die elektrische Stromstärke in den ersten Minuten bis zu einem Maximum (83 μA) an. Danach wird erneut ein Abfall der Stromstärke beobachtet. Diese fällt auf ca. 18 μA . Mit Erhöhung der Spannung ab der 90. Minute bzw. der 170. Minute erhöht sich auch die Stromstärke. Ein sich einstellender stationärer Zustand wird ab der 100. Minute erreicht.

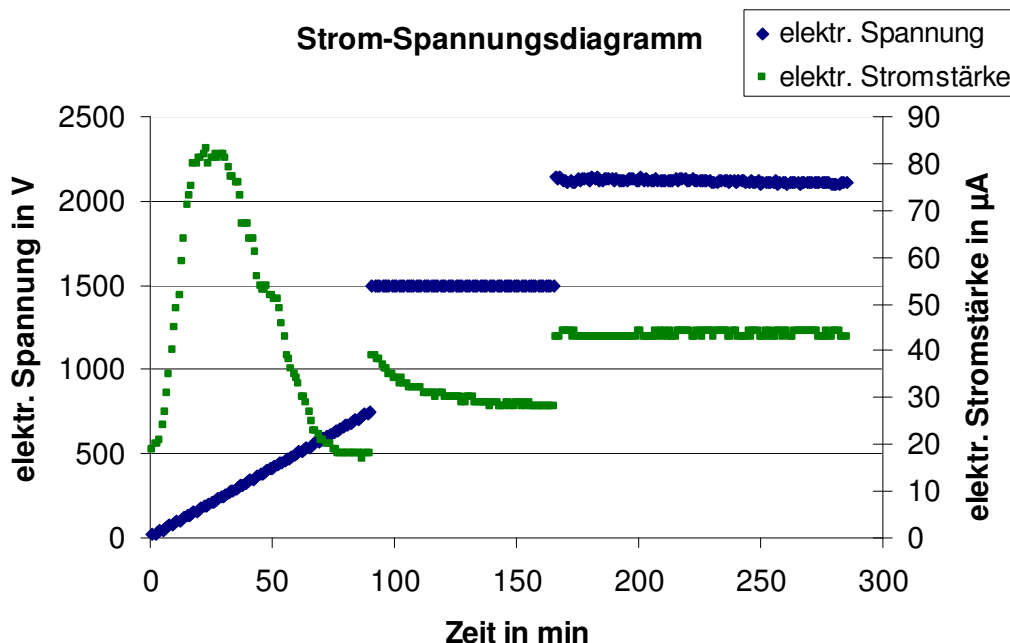


Abbildung 22: Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 2: 6600 Vh): Fokussierung von enzymatisch gespaltenem SLK (TLN, 37°C bei 4 Stunden) mit IPG-Streifen von 3-10

Während eines Versuchs zur Fokussierung von Kollagenfragmenten (boviner Standard vom Typ I) aus der Spaltung mit TLN zeigten sich im Strom-Spannungsdiagramm starke Schwankungen (Abb. 23). Im Vergleich zum Kurvenverlauf aus Abbildung 22 ist in den ersten Minuten kein gleichmäßiger Anstieg bzw. Abstieg der Stromstärke zu beobachten. Die Stromstärke steigt bis 50 μA an und fällt anschließend ab. In der 36. Minute werden 0 μA gemessen. Danach steigt die Stromstärke wieder an. Ein stationärer Zustand wird ebenfalls, wie in den zuvor beschriebenen Diagrammen, erreicht. Dieser wird ab der 150. Minute beobachtet. Es ist zu vermuten, dass innerhalb des IPG-Streifens (3-10) keine optimale Fokussierung von Kollagenfragmenten stattgefunden hat, da ein starkes Schwanken der Stromstärke im Vergleich zu Abbildung 22 im Strom-Spannungsdiagramm in den ersten Minuten beobachtet wird. Im entwickelten 2D-Gel waren anschließend nach der zweidimensionalen Auftrennung dieser Kollagenfragmente keine Spots erkennbar, sondern eine starke Färbung im oberen Bereich des 2D-Gels.

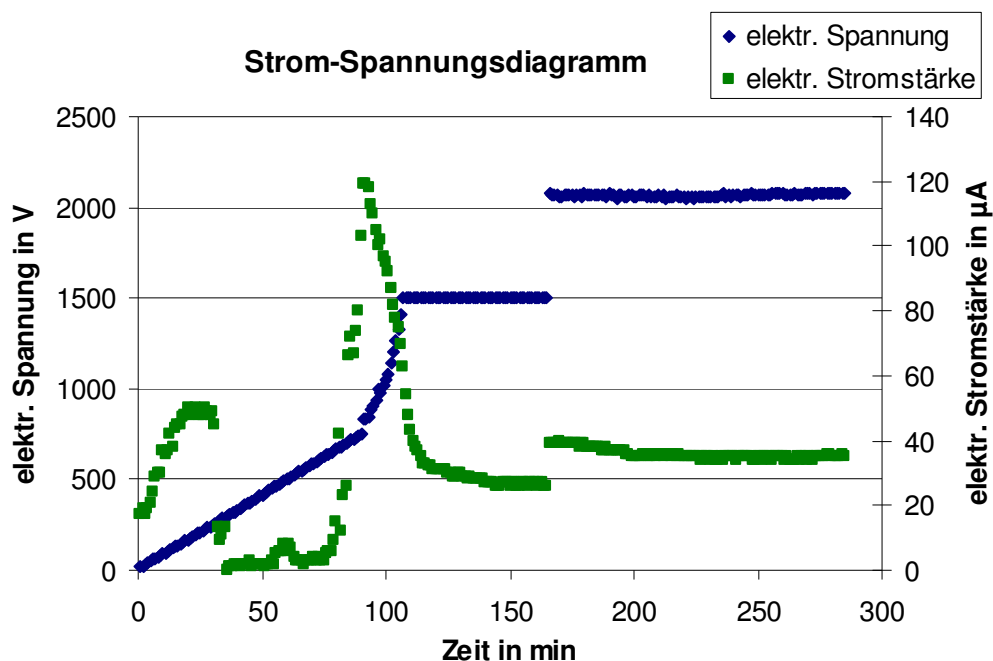


Abbildung 23: Strom-Spannungsdiagramm (Protokoll 2: 6600 Vh): Fokussierung von enzymatisch gespaltenem bovinen Kollagenstandard-Typ I (TLN, 37°C bei 4 Stunden) mit IPG-Streifen von 3-10

Anhand der erfassten Strom-Spannungsdiagramme während der Fokussierung von IPG-Streifen kann ein erster Eindruck darüber gewonnen werden, ob möglicherweise Probenbestandteile die Fokussierung stören und es sich anbietet, erneut eine Auftrennung in der ersten Dimension durchzuführen.

Weiterhin zeigten die fokussierten IPG-Streifen der enzymatisch erzeugten Kollagenfragmente im Vergleich zu den mit BrCN gespaltenem Kollagen Unterschiede auf. Bei einigen Experimenten wurden im mittleren Bereich des IPG-Streifens weißliche Rückstände beobachtet (Abb. 24). Dies deutet auf eine Kristallisation hin, wahrscheinlich hervorgerufen durch Ammoniumhydrogencarbonat im Probenpuffer. Dieser Effekt tritt bei Erhöhung der Voltstunden verstärkt auf. In dieser Arbeit waren dabei hauptsächlich Proben mit Kollagenfragmenten aus der TLN-Spaltung betroffen. Dagegen war dieser Effekt bei Proben mit Kollagenase- oder α -Chymotrypsin-gespaltenem Kollagen weniger ausgeprägt. In Abbildung 24 ist ein IPG-Streifen nach der Fokussierung mit TLN-gepaltenem SLK dargestellt. Der IPG-Streifen 3-10 wurde mit ca. 11000 Vh (Kapitel 3.3.4, Protokoll 3) fokussiert.

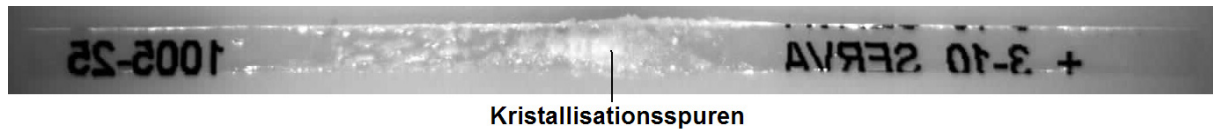


Abbildung 24: Kristallisationsspuren auf einem IPG-Streifens 3-10 nach der Fokussierung mit TLN-gepaltenem SLK mit 11000 Vh

4.3 Kollagen-BrCN-Peptide

Die Spaltung von Kollagen mit BrCN ermöglicht eine überschaubare Anzahl an gut charakterisierten Hydrolysefragmenten. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit eine Auftrennung von Kollagenfragmenten im zweidimensionalen Gel möglich ist. Um eine optimale Peptidkarte zur Charakterisierung der Hydrolysefragmente zu erhalten, wurden verschiedene 2D-Gele, IPG-Streifen und Fokussierbedingungen getestet. Im zweiten Teil sollte die Identifikation der Kollagentypen I und III anhand des spezifischen 2D-Peptidmusters erfolgen.

4.3.1 Auftrennung von Kollagen-BrCN-Peptiden

Die Auftragsmenge an Kollagenfragmenten wurde in den Versuchen konstant gehalten. Diesbezüglich wurden 40 µl des klaren Überstands der Probe mit dem Rehydratisierungspuffer gemischt und die IPG-Streifen jeweils im Puffer inkubiert (sample in-gel-Rehydratisierung). Die Färbung der 2D-Gele erfolgte mit Coomassie.

Es wurden 2D-Gele mit Polyacrylamidkonzentrationen von 12 %, 14 % und 8-16 % für die Auftrennung von Kollagen-BrCN-Peptiden verwendet. Diesbezüglich waren in allen erstellten Peptidkarten Spots zu erkennen. Besonders gute Massenaufentrennungen wurden in homogenen 2D-Gelen mit einer Polyacrylamidkonzentration von 12 % erreicht.

Fokussierbedingungen:

Die Fokussierbedingungen können je nach Streifenlänge, Gradient, Probenmaterial und vorhandener Geräteausrüstung variieren. Für die in dieser Arbeit verwendeten IPG *BlueStrips* der Firma Serva mit einer Länge von 7 cm wird entsprechend der Bedienungsanleitung für die Streifen ein Fokussierprogramm nach Tabelle 13 empfohlen.

Tabelle 13: Richtlinie zur Fokussierung von IPG *BlueStrips* (7 cm) der Firma Serva

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	Dauer [Vh]
1	150	0,5	75
2	300	0,5	150
3	600	0,5	300
4	1500	1,5	2250
5	3000	2-2,5	6000-7500
gesamt			8700-10200²

² IPG BlueStrips pH 3-10/3-10NL:

Fokussierung bis 8,7 kVh (5 Stunden)

IPG BlueStrips pH 4-7/3-6/6-10:

Fokussierung bis 10,2 kVh (5,5 Stunden)

Mit Hilfe der Richtlinie (Tab. 13) und bereits vorinstallierten Programmen der Fokussiereinheit wurden verschiedene Fokussierbedingungen getestet.

In Abbildung 25 ist eine Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK dargestellt, bei der die Peptide mit ca. 11000 Vh (Protokoll 3, Kapitel 3.3.4) fokussiert wurden. Für die Auftrennung wurde ein 12 %iges PAG (2D-Gel) sowie ein nichtlinearer (NL) IPG-Streifen von 3-10 verwendet. Davon ausgehend, dass die Peptide ausreichend fokussiert waren, wurde zum Vergleich eine Peptidkarte mit geringeren Voltstunden erstellt (Abb. 26). Diesbezüglich wurde ein IPG-Streifen 3-10NL mit ca. 3500 Vh fokussiert. Die markanten Unterschiede beider Abbildungen zueinander sind markiert.

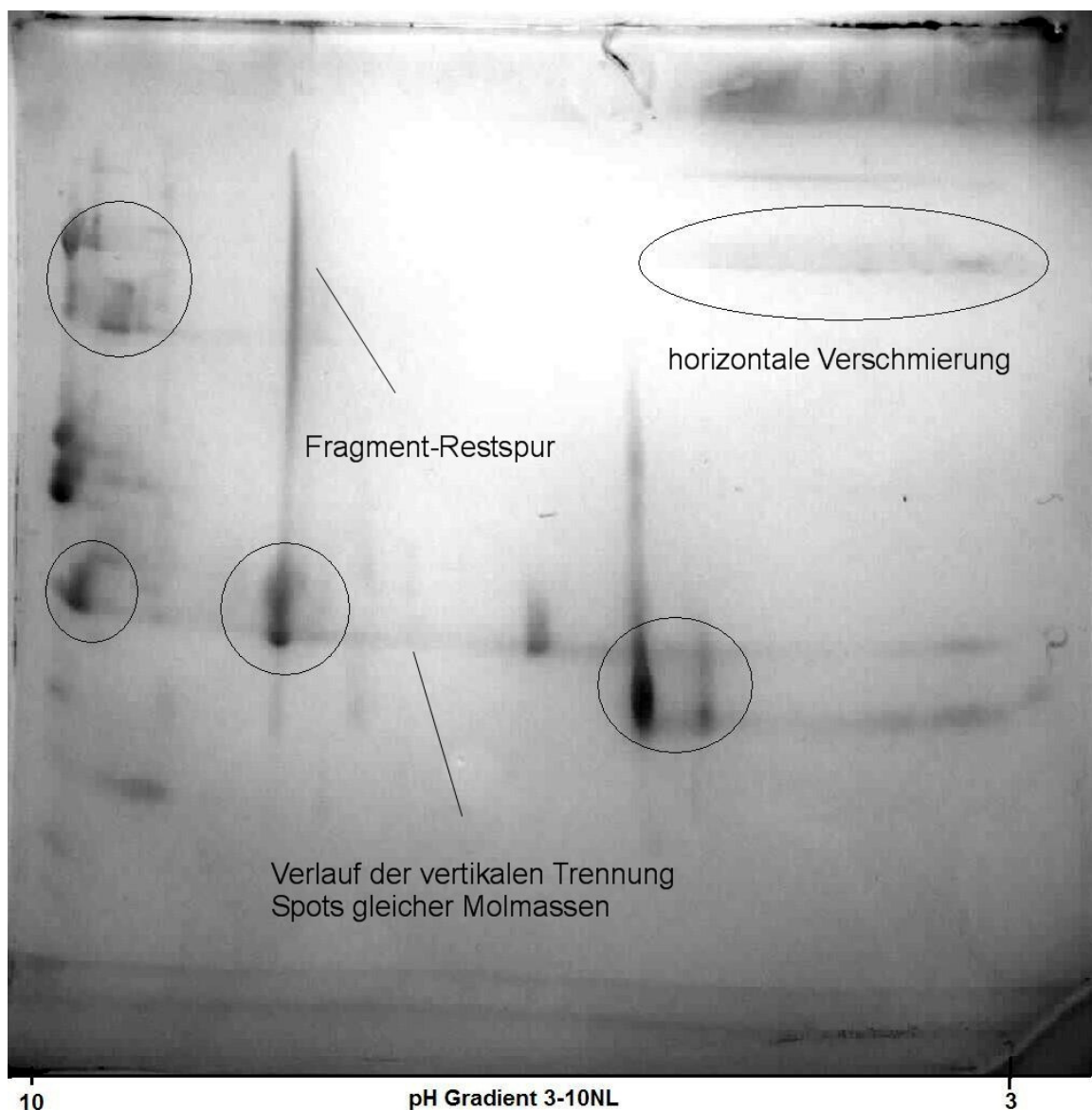


Abbildung 25: Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10NL und 11000 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension. Auffällige Unterschiede zur Trennung mit niedrigeren Voltstunden sind im Gel markiert.

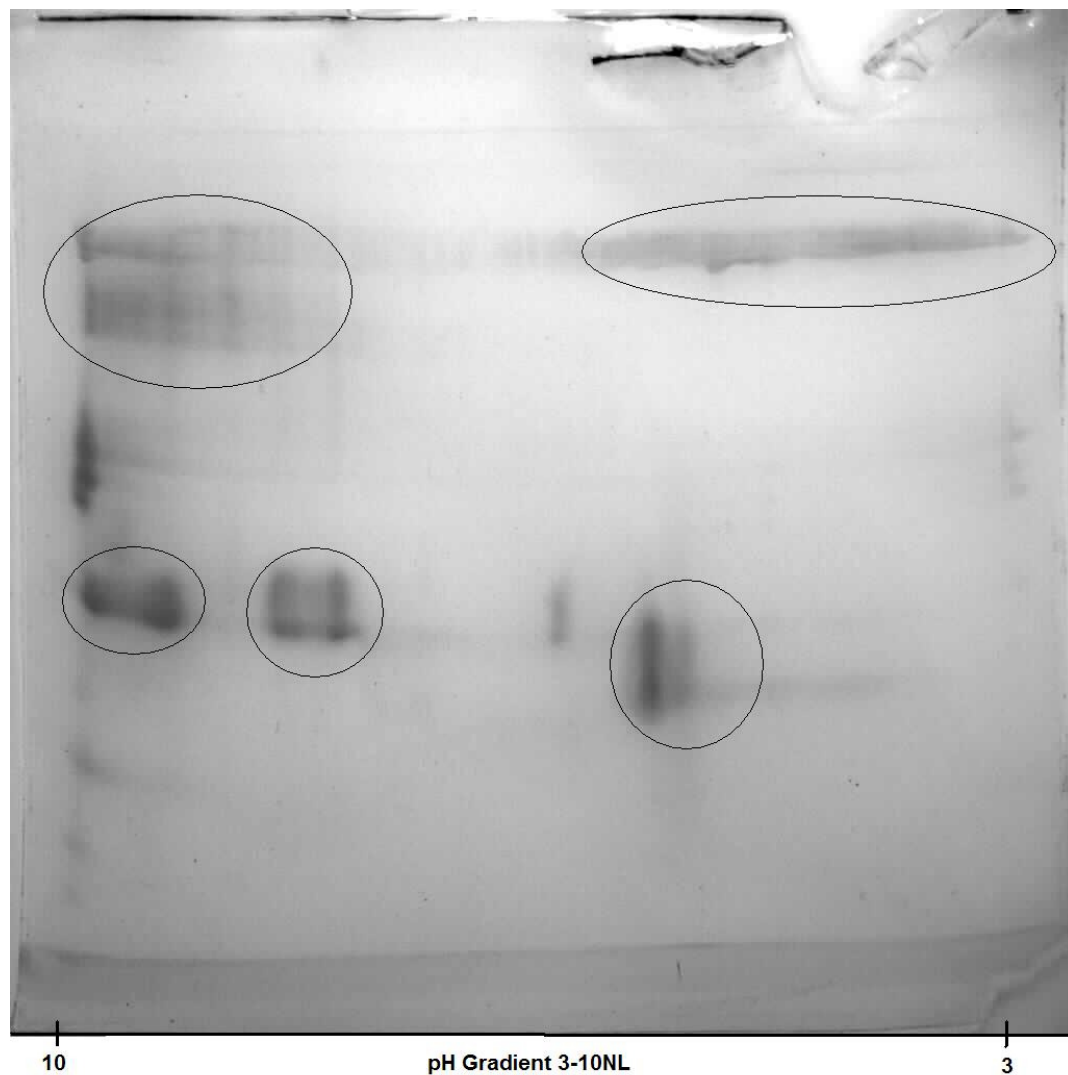


Abbildung 26: Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10NL und 3500 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension. Auffällige Unterschiede zur Trennung mit höheren Voltstunden sind im Gel markiert.

In beiden Peptidkarten (Abb. 25 und 26) sind horizontale Verschmierungen zu erkennen. Diese sind in Abbildung 26 stärker ausgeprägt. Es ist zu vermuten, dass dieses Phänomen auf eine Kombination geringer Voltstunden und der in-Gel-Rehydratisierung zurückzuführen ist [Görg et al. 2007]. Aufgrund der in-Gel-Rehydratisierung ist die Probe in der gesamten Länge des Streifens verteilt, wodurch die Peptide des SLKs bei nicht ausreichenden Voltstunden im Gel vermutlich verschmieren. Weiterhin ist der Verlauf der Trennung nach der Molmasse in beiden Gelen erkennbar. Während der Trennung der Kollagenpeptide nach der Masse wurde bei allen Auftrennungen beobachtet, dass der Bromphenolblaustreifen nicht geradlinig vom IPG-Streifen in das 2D-Gel verläuft. Vielmehr verläuft dieser meniskusartig (konkav). Dieser Verlauf ist gut ausgeprägt in Abbildung 25 zu erkennen. Des

Weiteren sind Fragment-Restspuren sowohl in Abbildung 25 als auch in Abbildung 26 sichtbar. Vermutlich hervorgerufen durch hoch konzentrierte Kollagenpeptide. Diese Restspuren verblassen, je länger die Gele in Wasser entfärbt werden.

Im direkten Vergleich der Peptidkarten zueinander wird deutlich, dass in Abbildung 26 zusätzliche Spots erkennbar sind. Für die nachfolgenden Versuche erfolgte aus diesem Grund eine Fokussierung der IPG-Streifen mit niedrigen Voltstunden. Diesbezüglich wurde ein Fokussierprogramm entwickelt, welches an den Experimenten von *Benya* (1981) angelehnt ist. Dabei werden die IPG-Streifen mit ca. 1370 Vh (Protokoll 1, Kapitel 3.3.4) fokussiert.

pH-Gradient:

Zunächst wurden die Proben in einem pH-Gradient von 4 bis 7 fokussiert. Innerhalb der Peptidkarten zeigten sich jedoch nur wenige Spots, welche im mittleren Bereich des Gradienten bis hin zum größten pH-Wert zu erkennen waren. Um einen größeren pH-Bereich abzudecken, wurden IPG-Streifen mit einem linearen sowie mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von 3-10 verwendet. Im direkten Vergleich dieser Streifen zueinander wurden in den erstellten 2D-Gelen keine signifikanten Unterschiede der erkennbaren Spots festgestellt. Des Weiteren sind in den Peptidkarten (Abb. 25 und 26), in denen eine Auftrennung von gespaltenem SLK mit IPG Streifen von 3-10NL erfolgte, keine Spots im sehr sauren pH-Bereich zu erkennen. Viele Spots liegen in den 2D-Gelen am Ende des pH-Gradienten (basischer Bereich). Deshalb wurden die Kollagen-BrCN-Peptide im Weiteren auf IPG-Streifen von 6-10 fokussiert.

Eine mit einem IPG-Streifen von 6-10 erstellte Peptidkarte ist in Abbildung 27 dargestellt. Es sind Spots auf der gesamten Länge des pH-Gradienten zu erkennen, wodurch sich dieser Gradient gut eignet, die Kollagen-BrCN-Peptide in der ersten Dimension aufzutrennen. Jedoch verschmieren die Spots sehr stark. Für weiterführende Versuche empfiehlt es sich aus diesem Grund das Probenvolumen von 40 µl zu verringern. Weiterhin könnte anstatt der *sample-in-Gel-Rehydratisierung* die Probe direkt auf dem IPG-Streifen aufgetragen werden (cup-loading).

Neben sehr stark ausgeprägten Spots, sind im unteren Bereich des 2D-Gels schwache Spots erkennbar (Markierung in Abb. 27). Weiterhin sind die Isoformen eines Kollagen-BrCN-Peptids gleicher Molmasse markiert. Der Verlauf der Massenauftrennung dieses Peptids ist im 2D-Gel noch gut zu erkennen.



Abbildung 27: Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension. Markiert sind die Isoform eines Kollagen-BrCN-Peptids gleicher Molmasse sowie schwach erkennbare Spots im unteren Bereich des 2D-Gels.

Es zeigte sich, dass mit ca. 1370 Vh fokussierte IPG-Streifen von 6-10 und 12 %igen 2D-Gelen Peptidkarten erstellt werden können, welche eine gute Darstellung von gespaltenem Rinder-SLK durch BrCN ermöglichen.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit eine tatsächliche Auftrennung der Kollagenfragmente sowohl nach pI als auch nach Molmasse stattfindet, um zu prüfen, ob die Methode des „Peptide Mappings“ geeignet ist, Kollagentypen zu identifizieren. Diesbezüglich wurde eine SLK-Probe verwendet, welche nachweislich (Abb. 28) charakteristische Kollagen-BrCN-Peptide enthält. Die Auftrennung der Probe erfolgte einzeln nach pI und Molmasse sowie kombiniert (2D-GE).

In Abbildung 28 ist die Trennung der Peptide nach der Molmasse dargestellt. Dabei sind charakteristische Fragmente entstanden. Im Vergleich dazu ist in Spur 1 eine Probe aus

einer früheren Spaltung von SLK mit BrCN aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass zusätzliche Banden in Spur 2 vorhanden sind, was auf eine gute Spaltausbeute hindeutet.

Eindeutig wurden die Peptide CB 3-5, CB 3-7, CB 3-8, CB 7, CB 8, CB 6 und CB 3 des Typ I-Kollagen identifiziert. Oberhalb des CB 7 könnte die CB 4 Bande liegen. Jedoch ist diese nicht eindeutig erkennbar. Weiterhin sind die Banden unterhalb des CB 3 nicht eindeutig zuzuordnen. Es ist zu vermuten, dass es sich dabei um die CB 4 und CB 8 Bande des Typ III-Kollagen handelt.

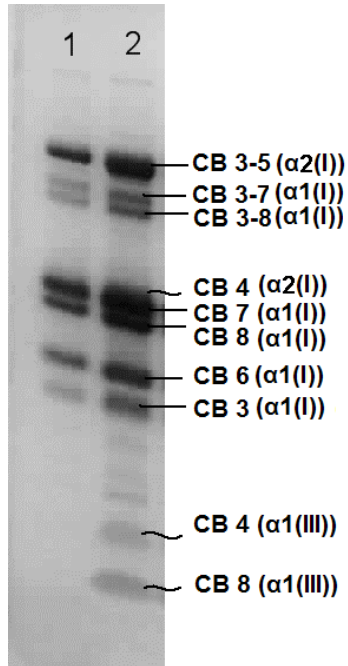


Abbildung 28: Darstellung der Kollagen-BrCN-Peptide von Rinder-SLK (*Spur 1:* frühere Probe; *Spur 2:* Probe für die zweidimensionale Auftrennung)

Die Auftrennung nach dem pI ist in Abbildung 29 dargestellt. Nach der Fokussierung mit ca. 1375 Vh wurde der IPG-Streifen 6-10 mit *Densi Stain Blue G* (Kapitel 3.3.6) eingefärbt. Es sind Banden im Gel erkennbar. Demzufolge hat eine Auftrennung der Kollagenfragmente nach dem pI stattgefunden. Erkennbare Banden des IPG-Streifens sind für eine bessere Zuordnung im 2D-Gel nummeriert. An der Kathodenseite weist das Gel Unregelmäßigkeiten auf. Beim Abziehen der Schutzfolie kann bei älteren Streifen ein Teil des getrockneten Polyacrylamids mit abgezogen werden, worauf diese Unregelmäßigkeiten im Gel zurückzuführen sind.

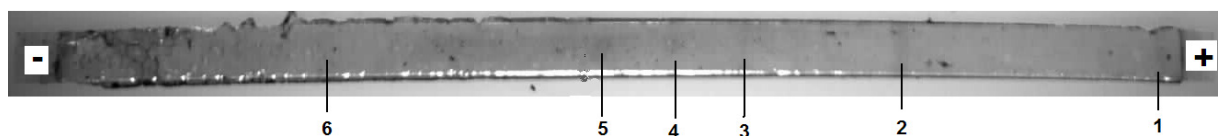


Abbildung 29: Eingefärbter IPG-Streifen von 6-10 nach der Fokussierung mit 1370 Vh. Erkennbare Banden sind im Gel gekennzeichnet.

In der erstellten Peptidkarte sind gut erkennbare Spots zu finden (Abb. 30). Innerhalb des 2D-Gels sind die möglichen Banden des IPG-Streifens (Abb. 29) gekennzeichnet. Es ist eine Übereinstimmung ersichtlich, weshalb vermutet wird, dass ein Übergang der Kollagenfragmente in das 2D-Gel stattgefunden hat. Weiterhin deutet die Vielzahl der erkennbaren Spots darauf hin, dass die in Abbildung 28 charakteristischen Kollagen-BrCN-Peptide im 2D-Gel wiederzufinden sind.

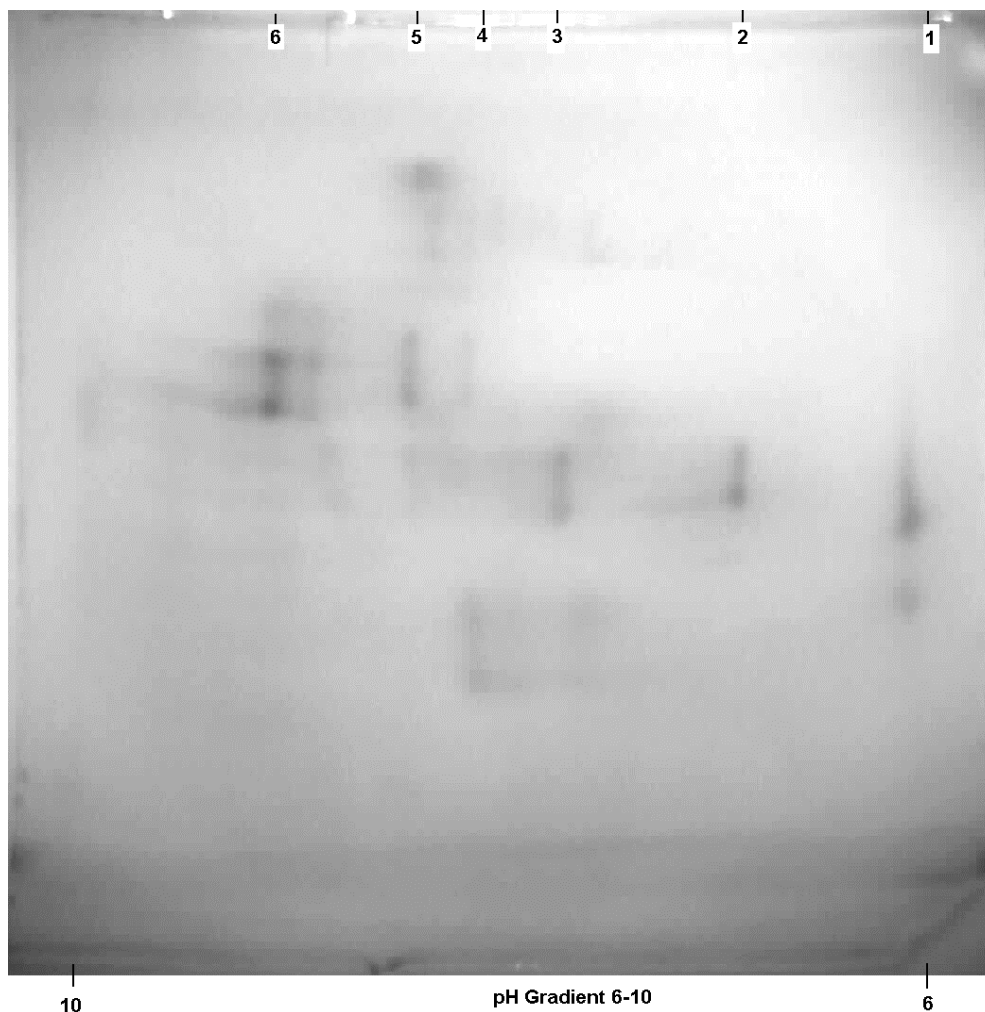


Abbildung 30: Peptidkarte von BrCN gespaltenem SLK (100 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension. Die nummerierten Banden deuten die Banden im IPG-Streifen an.

4.3.2 Identifizierung von Kollagentypen

Zur Unterscheidung zwischen Typ I- und Typ III-Kollagen wurden kommerzielle Kollagenstandards mit BrCN gespalten. Als Probenmenge für die 2D-GE wurden jeweils 70 µg Probe aufgetragen. Für eine eindeutige Identifizierung der Peptide im 2D-Gel wurde

zusätzlich zum fokussierten IPG-Streifen die in Abbildung 28, 29 und 30 aufgetrennte Probe als Molmassenstandard mitgeführt.

In Abbildung 31 ist die Peptidkarte der Kollagen-BrCN-Peptide des Typ III-Standards dargestellt. Der Molmassenstandard ist aufgrund von Diffusion in die Agarose und unzureichender Trennung zwischen der Probentasche und dem Streifen in das Gel hineingelaufen. Dies ermöglicht gleichzeitig die Peptide eindeutig zu identifizieren. Jedoch könnten schwache Spots durch den Standard auch überdeckt werden. Innerhalb des Gels sind Spots erkennbar. Eine Verschmierung, wie dies in den vorherigen Auftrennungen beobachtet wurde, ist nicht zu erkennen. Die Kollagenfragmente des Typ I zeigen, dass der Typ III-Kollagenstandard Verunreinigung von Typ I-Kollagen enthält (10 %- laut Hersteller).

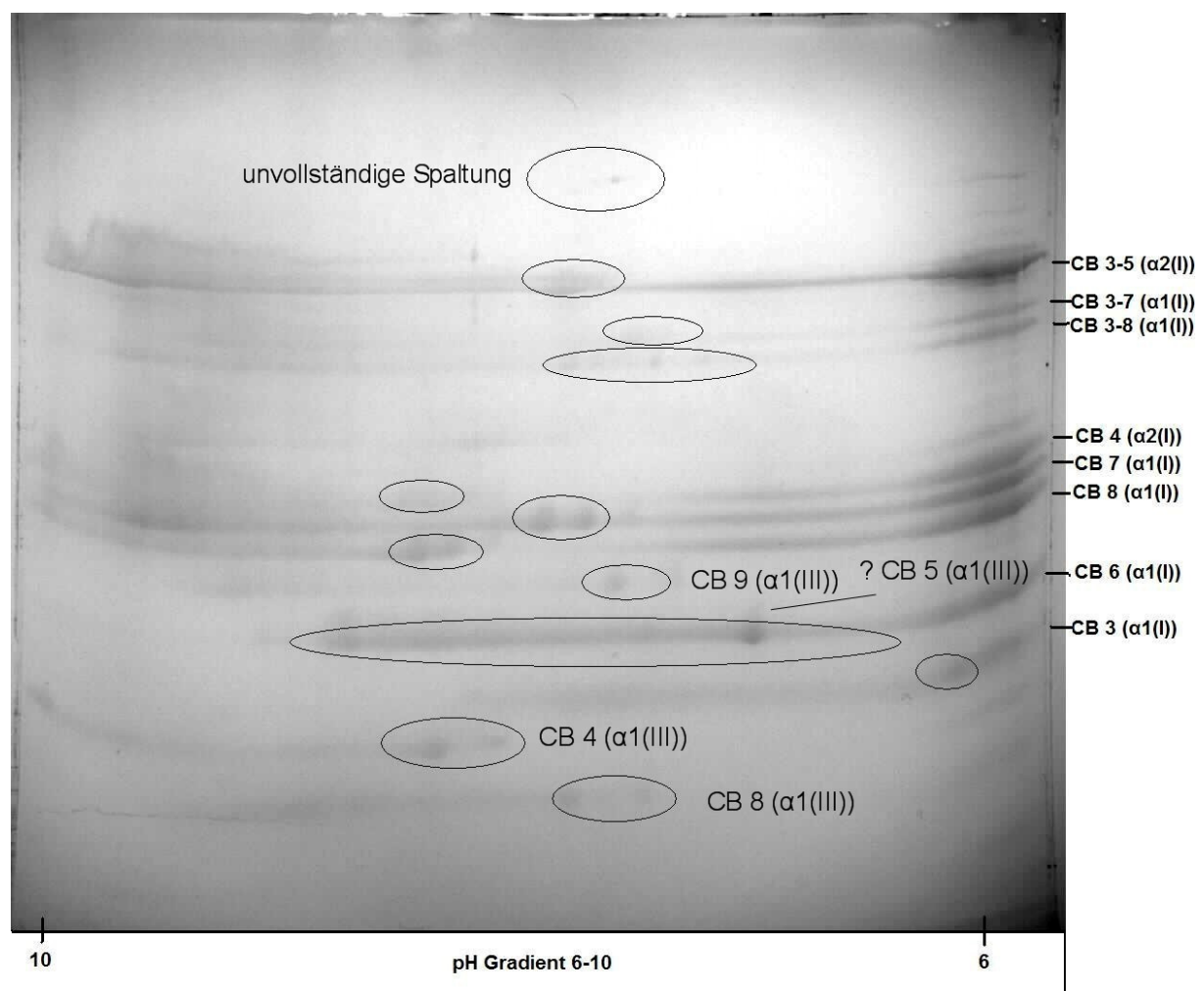


Abbildung 31: Peptidkarte von BrCN gespaltenem bovinen Kollagenstandard Typ III (70 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension.

Innerhalb der Peptidkarte sind die charakteristischen Peptide CB 3-5, CB 3-7, CB 3-8, CB 4, CB 7, CB 8, CB 6 und CB 3 des Typ I erkennbar. Oberhalb des CB 3-5 deuten vorhandene Spots auf unvollständig gespaltene Peptide hin.

Neben den Peptiden des Typ I wurden durch den Vergleich mit den Untersuchungen von *Tanaka et al.* (1981), *Benya* (1981) sowie *Cole und Chan* (1981) die Peptide CB 9, CB 4 und CB 8 des Typ III identifiziert. Oberhalb des deutlich erkennbaren Spots des CB 6 ($\alpha_1(I)$) könnte sich das CB 5 ($\alpha_1(III)$) befinden. Dabei wird das Peptid wahrscheinlich aufgrund der hohen Konzentration des CB 6 leicht überdeckt.

Ausgehend von der Lage der Spots in Abbildung 31, erfolgte eine Zuordnung der Kollagenfragmente des aus Abbildung 30 aufgetrennten Rinder-SLK (gespalten durch BrCN). Es ist zu vermuten, dass es sich bei den markierten Spots um die jeweiligen Kollagen-BrCN-Peptide handelt. Weiterhin könnte es sich bei den im Gel weit unten liegenden Spot um das CB 8 des Typ III-Kollagens handeln (Abb. 32). Infolgedessen wird erstmals in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Identifizierung von Kollagentypen mit Hilfe der Methode des „Peptide Mappings“ möglich ist.

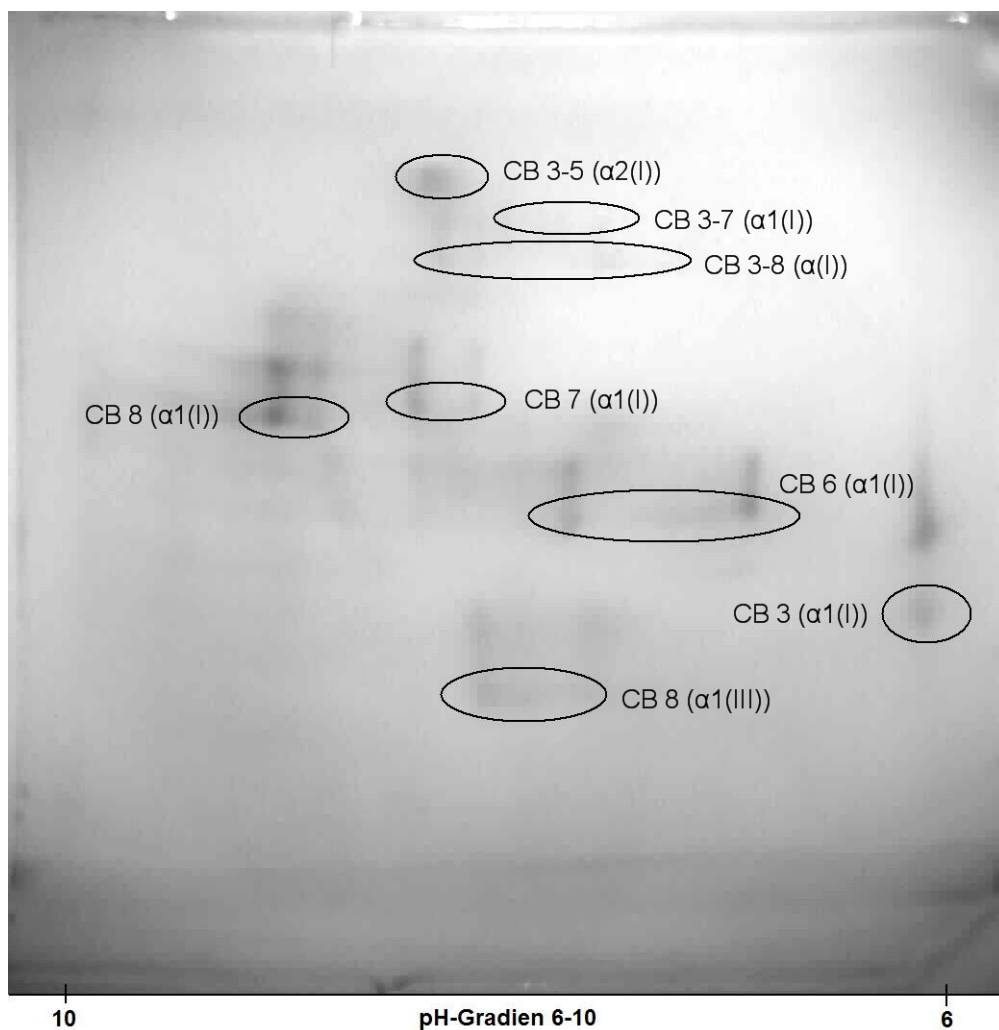


Abbildung 32: Zuordnung von Spots der in Abb. 30 dargestellten Peptidkarte (BrCN gespaltenes SLK)

Innerhalb der Peptidkarte des Typ I-Kollagens (BrCN gespaltenen Kollagenstandard) sind keine eindeutigen Spots für eine Identifizierung erkennbar (Abb. 33). Im Gel zeigt sich wieder eine starke Schmierung. Dies ist vermutlich auf eine höhere Konzentration zurückzuführen. Es wurde zwar die gleiche Probenmenge aufgetragen, jedoch beträgt die Konzentration der Peptide nicht 10 % sondern 100 % (Typ I). Deshalb empfiehlt es sich die Probenmenge weiter zu verringern. Ausgehend vom Massenstandard und der Lage der Spots aus Abbildung 31 sind mögliche Spots markiert.

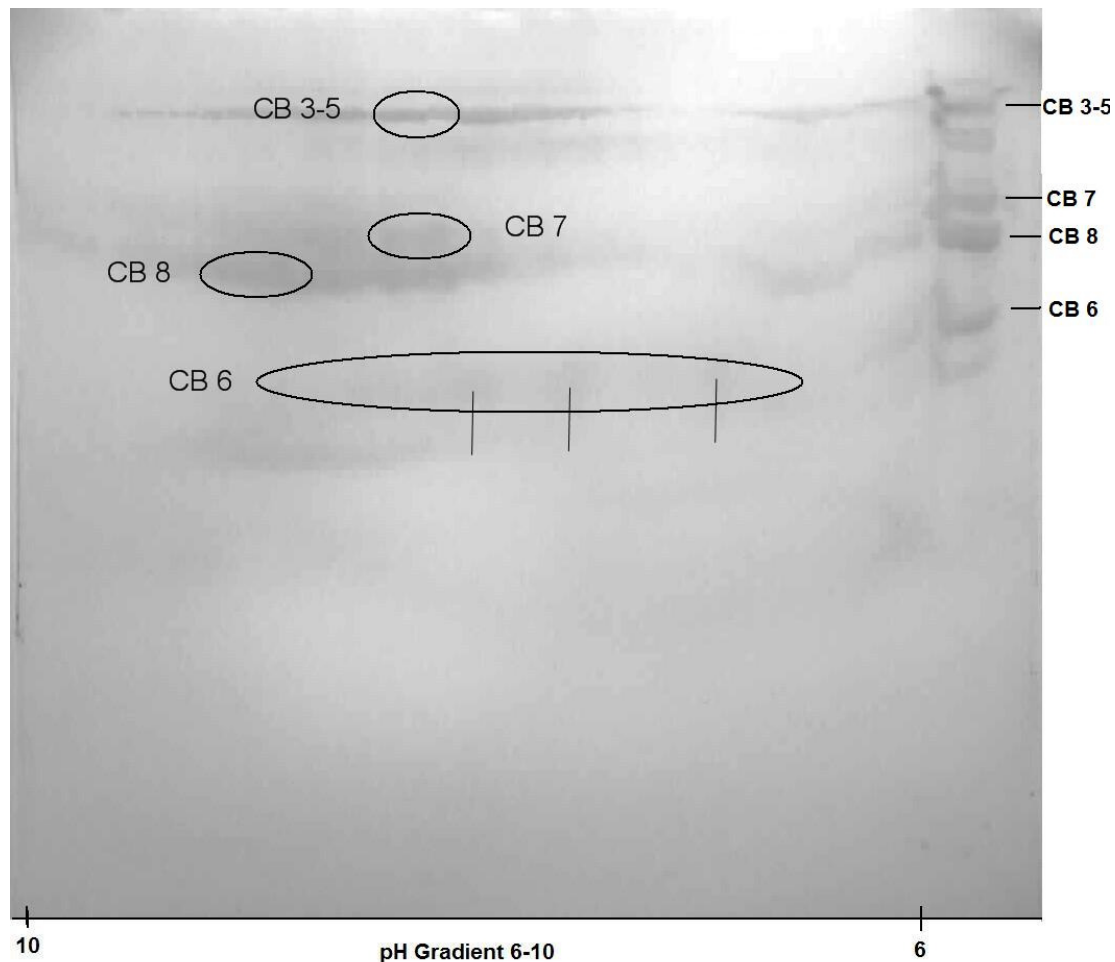


Abbildung 33: Peptidkarte von BrCN gespaltenem bovines Kollagenstandard Typ I (70 µg): Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 6-10 und 1370 Vh sowie mit einem 12 %igem PAG in der zweiten Dimension. Mögliche Spots sind markiert.

4.4 Enzymatisch gespaltene Kollagenfragmente

Innerhalb dieser Arbeit sollte das Rinder-SLK mit Hilfe spezieller Enzyme in definierte Peptide gespalten werden. Durch die Analyse dieser Peptide mittels SDS-GE sowie isoelektrischer Fokussierung sollten spezifische Peptidkarten der Hydrolysefragmente im Vergleich zueinander erstellt werden. Zunächst wird die enzymatische Spaltung des SLKs näher untersucht. Danach werden die verschiedenen Peptidkarten dargestellt. Durch die enzymatische Spaltung von Kollagenstandards sollte anschließend untersucht werden, inwieweit eine Identifizierung von Kollagentypen möglich ist.

4.4.1 Enzymatische Spaltung

Die Erzeugung von Hydrolysefragmenten aus Kollagen erfolgte entweder durch mikrobielle Kollagenase, TLN oder α -Chymotrypsin. Um zu sehen, inwieweit das Rinder-SLK durch die speziellen Enzyme gespalten wird und bei welcher Reaktionszeit ein gutes Spaltergebnis erzielt werden kann, wurde ein Zeitversuch zur Bestimmung des Abbaugrades durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 ohne vorherige Hitzedenaturierung dargestellt. Die Berechnung des prozentualen Abbaugrades erfolgte mit Hilfe der Gleichung 8 (Kapitel 3.3.3). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Enzymlösung wurde bei der Bestimmung des Blindwertes durch destilliertes Wasser ersetzt.

Am Anfang ist bei Kollagenase und TLN ein Anstieg des Abbaugrads in Abhängigkeit der Zeit zu erkennen. Dabei wird bei der Kollagenase ein maximaler Abbaugrad von 70 % nach vierstündiger Reaktionszeit erreicht. Mit zunehmender Reaktionszeit ist diesbezüglich keine Erhöhung des Abbaugrades festzustellen. Der prozentuale Abbaugrad von TLN liegt zwischen dem von α -Chymotrypsin und Kollagenase. Bei einer vierstündigen Reaktionszeit ist bei TLN ein Abbaugrad von 39 % zu erkennen. Dieser steigt in Abhängigkeit von längeren Reaktionszeiten leicht an. Bei einer Reaktionszeit von 16 Stunden ist im Diagramm das Maximum des Abbaugrads zu erkennen (über 50 %). Hingegen ist bei α -Chymotrypsin das Maximum (~20 %) der Spaltung bereits innerhalb der ersten Stunde erreicht. Mit längeren Reaktionszeiten wird keine signifikante Erhöhung des Abbaugrades erreicht.

Es ist zu vermuten, dass aufgrund der Reaktionstemperatur von 37°C die Tertiärstruktur des Kollagens beeinflusst wird, wodurch ein Abbau des nativen SLK durch TLN und α -Chymotrypsin möglich wird. Frühe Untersuchungen an löslichem Kollagen zeigten, dass beim Erwärmen von Kollagenlösungen auf 38°C die Moleküle in ihre Peptidketten zerfallen [Graßmann et al. 1961; Kühn 1967].

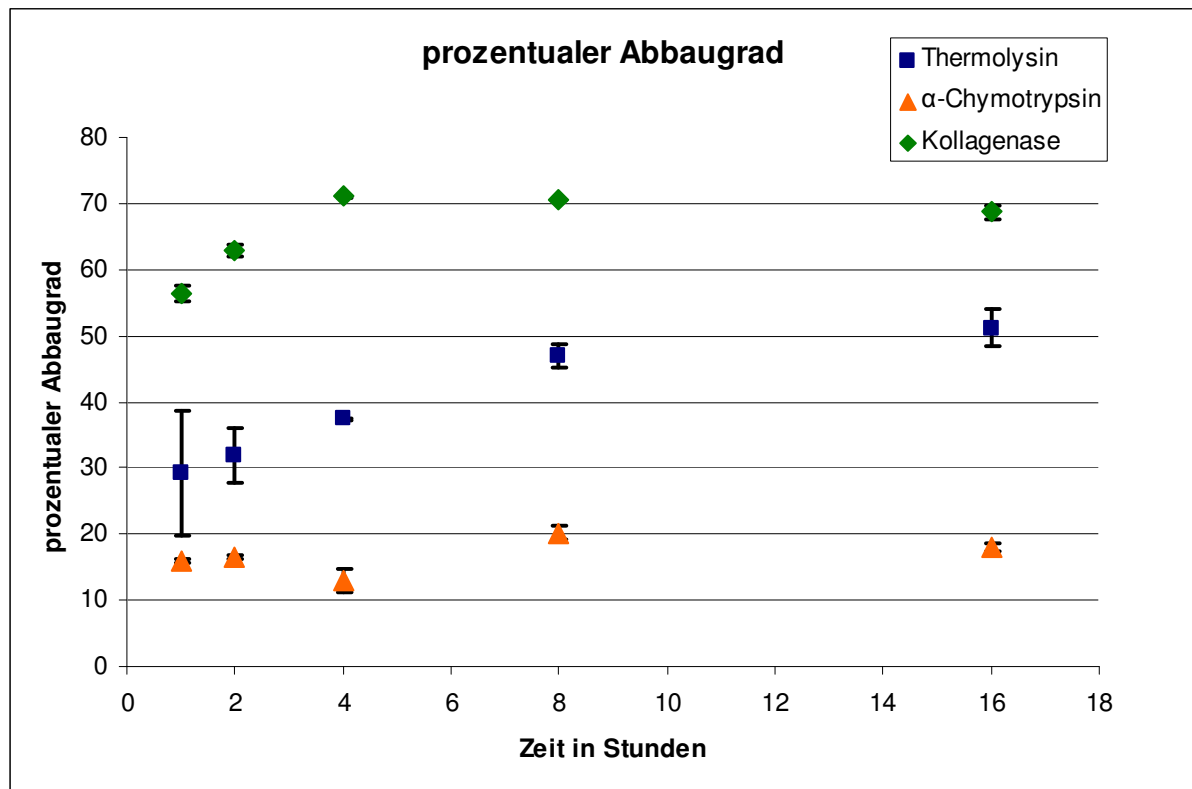


Abbildung 34: Prozentualer Abbau von Rinder-SLK durch verschiedene Enzyme bei 37 °C

Beim enzymatischen Abbau von denaturiertem SLK zeigten alle drei Enzyme ähnliche Werte, unabhängig von der Reaktionszeit. Aufgrund der hohen Temperatur (85 °C) geht ein Teil des Kollagens in Lösung, wodurch eine genauere Betrachtung des enzymatischen Abbaus mit dieser Methode schwierig wird.

Der Zeitversuch veranschaulicht, dass bei einer Reaktionszeit von vier Stunden ein gutes Spaltergebnis erzielt werden kann. Aus diesem Grund wurden vorrangig Spaltfragmente untersucht, welche bei einer Reaktionszeit von vier Stunden entstanden sind.

Die Proben, sowohl denaturiert als auch nativ, wurden zusammen mit den Enzymen in einem neutralen Gel aufgetragen und nach ihrer Molmasse aufgetrennt (Abb. 35). Zur Orientierung wurde zusätzlich ein Massenstandard mit aufgetragen. Es ist jedoch kein direkter Molmassen-Vergleich der Fragmente mit dem Standard möglich, da der Standard aus globulären Proteinen besteht.

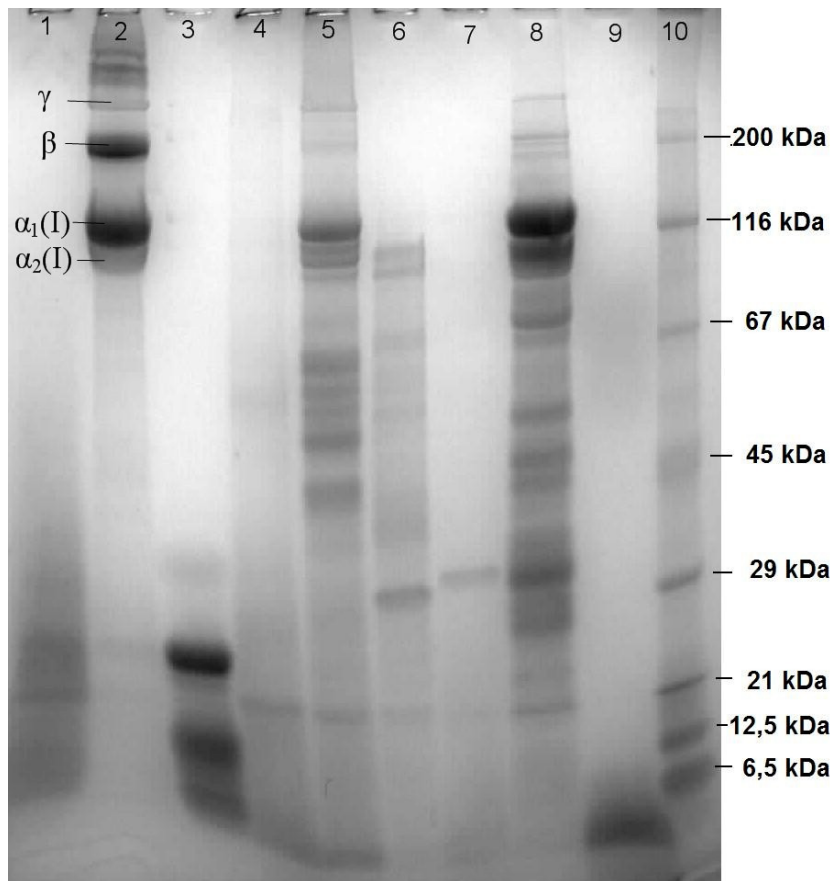


Abbildung 35: Darstellung von Spaltfragmente (SLK) und verwendeter Enzyme in einem neutralen 8 %igen PAG (*Spur 1:* durch α -Chymotrypsin gespaltene Fragmente von SLK (thermisch vorbehandelt); *Spur 2:* durch α -Chymotrypsin gespaltene Fragmente von SLK; *Spur 3:* α -Chymotrypsin; *Spur 4:* durch Kollagenase gespaltene Fragmente von SLK (thermisch vorbehandelt); *Spur 5:* durch Kollagenase gespaltene Fragmente von SLK; *Spur 6:* Kollagenase; *Spur 7:* durch TLN gespaltene Fragmente von SLK (thermisch vorbehandelt); *Spur 8:* durch TLN gespaltene Fragmente von SLK; *Spur 9:* TLN; *Spur 10:* globulärer Molmassenstandard)

Im direkten Vergleich ist zu erkennen, dass unter nativen Bedingungen wesentlich mehr Banden zu sehen sind. Vor allem die signifikanten α -, β - und γ -Banden des Kollagen sind deutlich erkennbar. Innerhalb des PAGs erfolgte eine Auftrennung der großen Moleküle (Trimere), mittleren Molekülen (Dimere) und der einzelnen Polypeptidketten. Diese Banden fehlen beim denaturierten Kollagen. Demnach ist zu vermuten, dass das denaturierte SLK besonders gut durch die Enzyme gespalten werden kann. Wahrscheinlich sind aufgrund der Strukturveränderung (Wärmebehandlung) und der enzymatischen Aktivität viele kleinere Fragmente entstanden, welche durch das Gel gelaufen sind.

Für die Reaktion war nur eine geringe Aktivität (20 U) bzw. Konzentration von Enzymen nötig. Damit einzelne Banden im Gel erkennbar werden, wurde die Konzentration der reinen Enzyme erhöht. Diesbezüglich ist die Bande von α -Chymotrypsin (*Spur 3*) besonders stark

ausgeprägt. Diese liegt zwischen 29 und 21 kDa. Dies entspricht sehr gut der relativen Molekülmasse von α -Chymotrypsin mit 25 kDa. Auf dieser Höhe sind ebenfalls Banden in Spur 1 und 2 erkennbar, was vermuten lässt, dass es sich dabei um das Enzym selbst handelt. Weiterhin sind neben der Bande zwischen 29 und 21 kDa noch weitere Banden erkennbar. Wahrscheinlich sind dies Untereinheiten von α -Chymotrypsin. Genauso sind mehrere Banden von Kollagenase zu sehen (Spur 6). Neben dem eigentlichen Enzym, vermutlich unterhalb von 116 kDa, sind weitere Banden vorhanden. Die stark ausgeprägte Bande (29 kDa) deutet auf eine Untereinheit hin. Innerhalb der Spur 9 ist keine Bande erkennbar. Vielmehr ist eine Art Zusammenlaufen in das Gel zu erahnen. In dieser Spur wurde TLN aufgetragen. Am Anfang wurde vermutet, dass die gewählte Konzentration zu niedrig war. Deshalb wurde in einem anderen Gel die Konzentration erhöht bzw. die Enzymlösung nicht bei 95°C erwärmt. In allen Spuren war keine Bande zu sehen. Es wird deshalb vermutet, dass das Enzym sich schlecht löst, wodurch eine Auftrennung erschwert wird. Besonders bei höheren Konzentrationen. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Banden in Spur 7 und 8 ausschließlich Kollagenfragmente sind.

Anhand der Ausprägung der $\alpha_1(I)$ - und $\alpha_2(I)$ -Banden der Spuren 2, 5 und 8 ist erkennbar, dass die Kollagenase deutlich mehr Ketten gespalten hat. Weiterhin scheint TLN die β -Komponenten besser im Vergleich zu α -Chymotrypsin zu spalten. Gleichzeitig verdeutlichen die Banden in Spur 8, dass durch TLN viele unterschiedliche Fragmente entstehen, welche besonders gut im Trennbereich des Gels liegen.

Die Banden unterhalb der $\alpha_2(I)$ -Ketten lassen vermuten, dass es sich dabei um verkürzte Ketten handelt (Spur 5 und 8), welche am Terminus gespalten wurden.

Für eine nähere Betrachtung der Spaltausbeute wurden die Spuren 2, 5 und 8 densitometrisch ausgewertet. Durch einen direkten Vergleich der Intensitäten (Absorption) ist eine präzisere Aussage möglich (Abb. 36). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gene Tools Analysensoftware (SYNGENE). Die Basislinien wurden mit der Hilfe der Methode des niedrigsten Anstiegs (lowest slope) korrigiert.

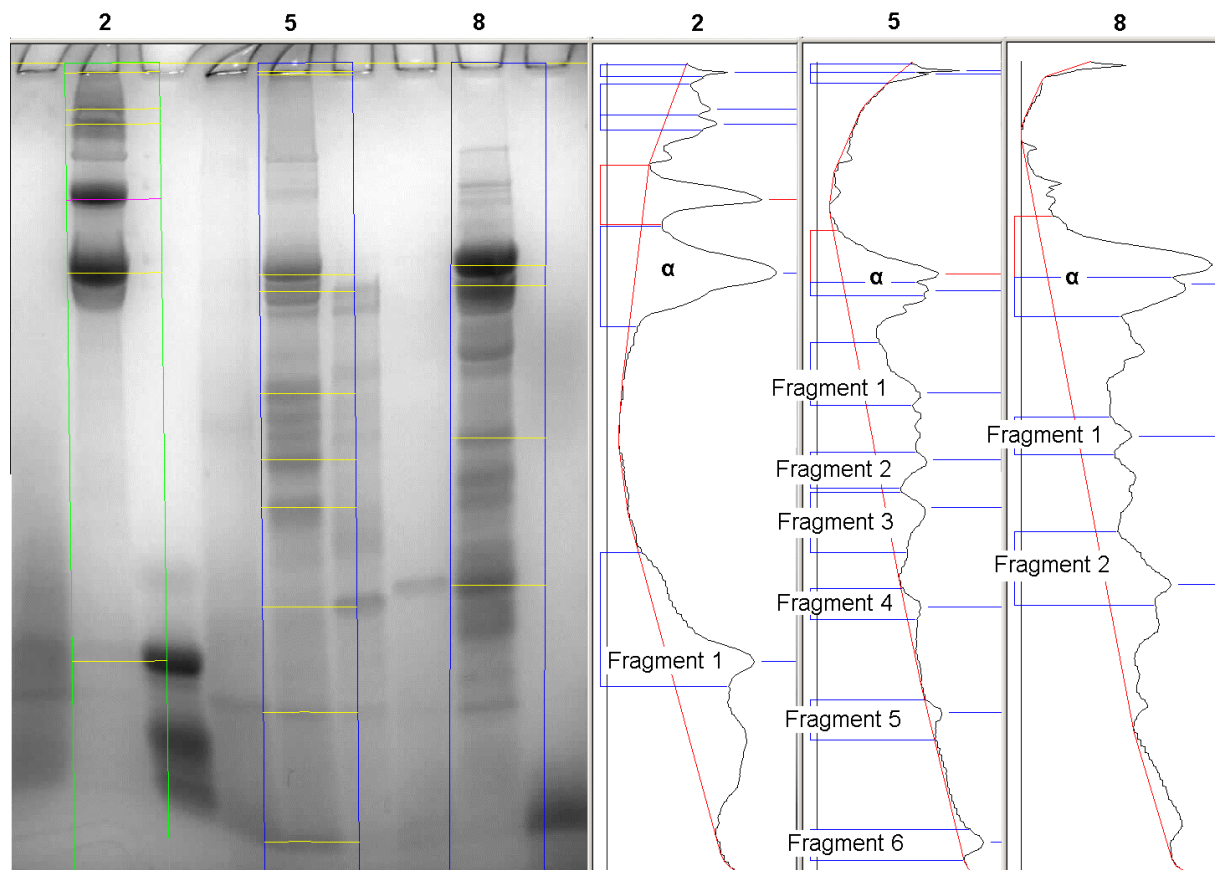


Abbildung 36: Densitometrische Auswertung der Spuren 2, 5 und 8

Im direkten Vergleich der Intensitäten der $\alpha(I)$ -Banden (α_1 und α_2) bestätigt sich, dass die Kollagenase die meisten Ketten gespalten hat (Tab. 14). Diesbezüglich ist der Peak im Vergleich zu den anderen Densitogrammen kleiner. Innerhalb der densitometrischen Auswertung wurden von der Software nicht alle Banden detektiert. Dennoch verdeutlichen die Peakflächen, dass in Spur 5 und 8 viele Banden hoher Intensitäten vorhanden sind, besonders unterhalb der $\alpha_2(I)$ -Ketten (Tab. 14).

Tabelle 14: Peakflächen der Densitogramme

Peakflächenbezeichnung	Spur 2 (Peakfläche)	Spur 5 (Peakfläche)	Spur 8 (Peakfläche)
α	705 455	376 220	1 039 512
Fragment 1	514 619	250 386	163 739
Fragment 2		134 431	340 775
Fragment 3		163 395	
Fragment 4		34 182	
Fragment 5		28 265	
Fragment 6		47 582	

4.4.2 Auftrennung der Hydrolysefragmente

Die Auftrennung der aus den enzymatischen Spaltungen erhaltenen Kollagenfragmente erfolgte in der zweiten Dimension jeweils in einem Gradientengel (8-16 %). Zur genauen Orientierung bzw. Beschreibung der Fragmente sowie zu Etablierung eines Koordinatensystems wurde ein pI-Standard zweidimensional aufgetrennt (Abb. 37). Auf der Abszisse wurde der pI-Wert bekannter Proteine aufgetragen. Die Fokussierung wurde auf einem IPG-Streifen von 3-10 nach Protokoll 3 (Kapitel 3.3.4) durchgeführt.

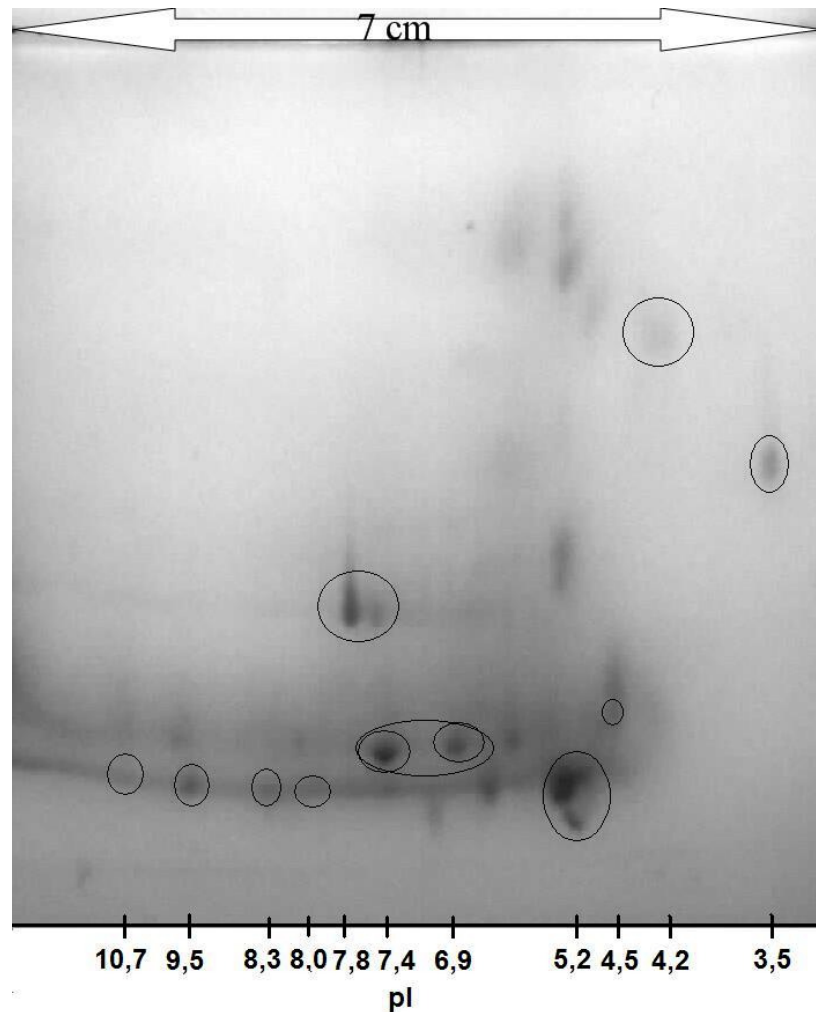


Abbildung 37: pI-Werte bekannter Proteine zur Etablierung einer Abszisse für die erste Dimension

Amyloglucosidase (<i>Aspergillus niger</i>)	pI 3,5
Glucose Oxidase	pI 4,2
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	pI 4,5
β-Lactoglobulin (Rind)	pI 5,2/5,3
Myoglobin (Pferd)	pI 6,9/7,4
Lectin (<i>Lens culinaris</i>)	pI 7,8/8,0/8,3
Ribonuklease A (Rinderpankreas)	pI 9,5
Cytochrome C (Pferd)	pI 10,7

Die Fokussierung des enzymatisch gespaltenen SLKs erfolgte jeweils mit ca. 6600 Vh (Protokoll 2, Kapitel 3.3.4) in der ersten Dimension (pH-Gradient 3-10).

Denaturiertes SLK

In Abbildung 38, 39 und 40 sind die Peptidkarten der Hydrolysefragmente von denaturiertem Rinder-SLK aus den Spaltungen mit Kollagenase, α -Chymotrypsin und TLN dargestellt. Für einen einheitlichen Vergleich wurden die Parameter wie Auftragsmenge und Färbung anfänglich gleich gesetzt. Das Auftragsvolumen betrug 4 μ l und gefärbt wurde mit *Densi Stain Blue G*.

Die durch Kollagenase-Spaltung erhaltenen Hydrolysefragmente von denaturiertem Kollagen konzentrieren sich in einem sauren pH-Bereich (pH 5,2) in unteren Regionen des Gels (Abb. 38). Diese sind bei einem geringen Probenvolumen und einer Coomassie-Färbung deutlich erkennbar, was auf eine hohe Konzentration hindeutet. Im Vergleich zu den anderen Peptidkarten sind relativ kleine Spots erkennbar. Diese liegen sehr dicht beieinander. Aus diesem Grund wurde die Auftrennung mit einem pH-Gradienten von 4 bis 7 wiederholt. Die aufgetrennten Fragmente sind als Bildausschnitt mit in die Peptidkarte zum Vergleich dargestellt. Vor allem die einzelnen Spots im pH-Bereich 5,2 sind deutlich zu sehen. Zusätzlich ist eine breitere Verteilung der Spots gut zu erkennen, was für eine reproduzierbare Auftrennung nach dem pH-Wert spricht.

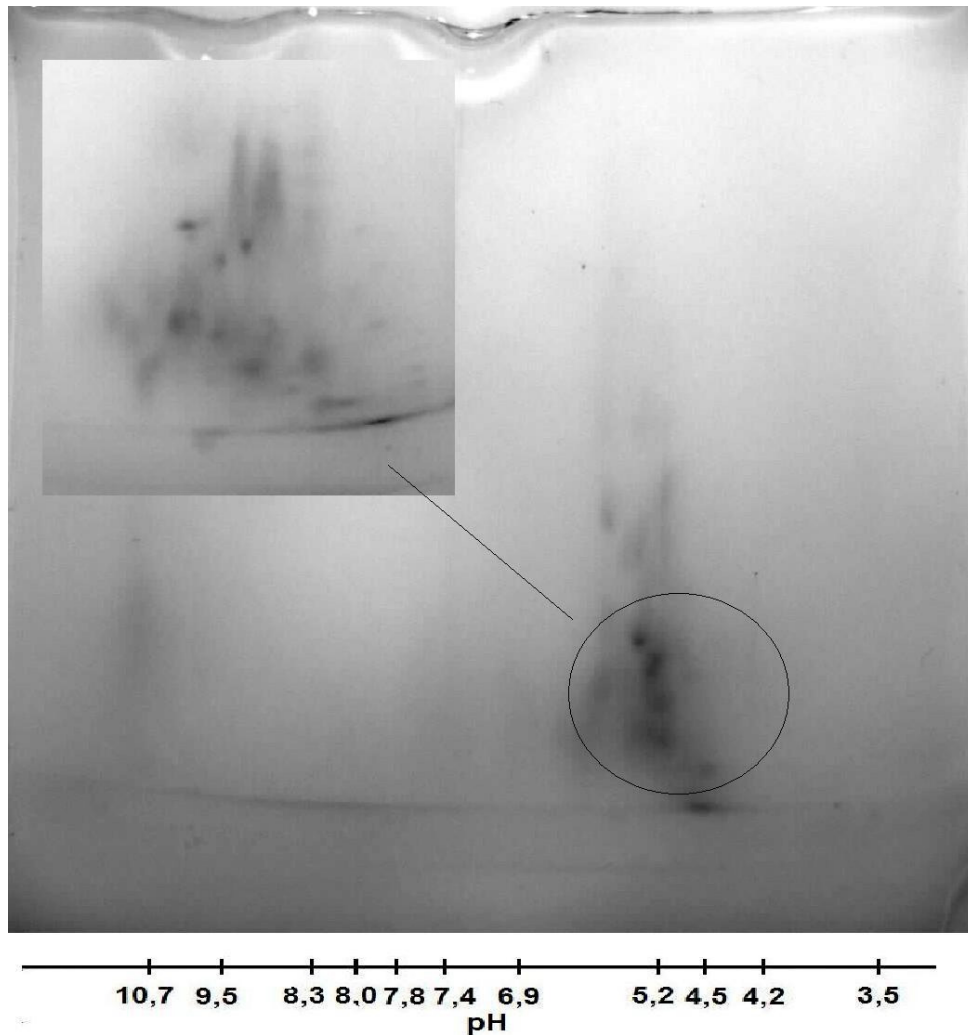


Abbildung 38: Durch Kollagenase gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (4 μ l Auftragsvolumen, Coomassie). Die markierten Fragmente sind in einem breiteren pH-Gradient (pH 4-7) weiter auseinandergezogen.

Innerhalb der ersten zweidimensionalen Auftrennung der Hydrolysefragmente von denaturiertem Kollagen nach Behandlung mit α -Chymotrypsin (4 μ l Probenvolumen und Coomassie-Färbung) waren nur sehr schwach gefärbte Spots erkennbar. Deshalb wurde das Probenvolumen auf 10 μ l erhöht. Nach der Coomassie-Färbung waren daraufhin deutlich stärkere Spots zu sehen. Um eventuell weitere vorhandene Spots sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend auch noch mit Silber gefärbt. In Abbildung 39 sind die zusätzlich gefundenen Fragmente markiert. Im Vergleich zur Kollagenase-Spaltung sind deutlich größere Spots vorhanden. Der Schwerpunkt der Fragmente befindet sich in mittlerer Gelhöhe. Weiterhin sind erkennbare Spots im gesamten Gel und damit über den gesamten pH-Bereich verteilt. Durch die Silberfärbung ist ein Fragment kleiner Molmasse bei einem pH-Wert zwischen 4,2-4,5 zu sehen.

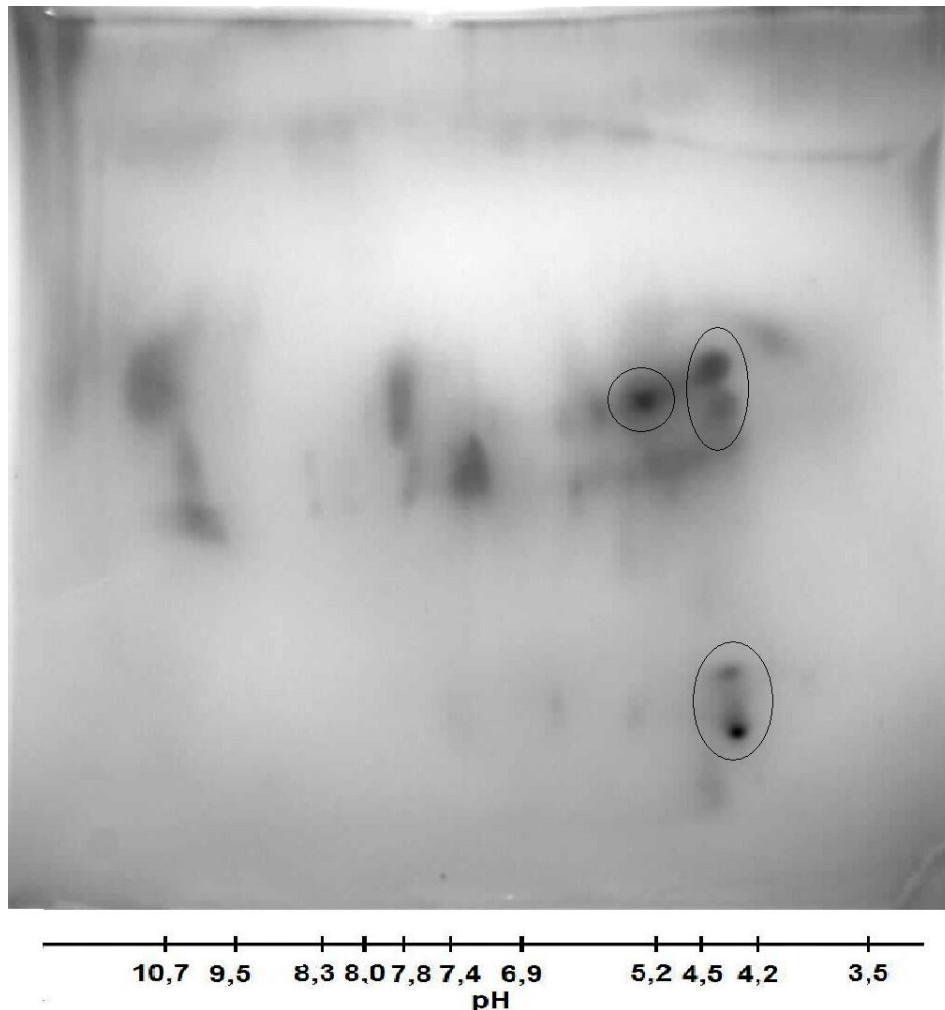


Abbildung 39: Durch α -Chymotrypsin gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (10 μ l Auftragsvolumen, Silberfärbung). Die markierten Spots sind nur unter Silberfärbung sichtbar.

Die Peptidkarte von mit TLN gespaltenem denaturiertem SLK ist in Abbildung 40 dargestellt. Es sind 2 schwache Spots erkennbar. Einer im mittleren Bereich des Gels bei einem pI zwischen 5,2 und 6,9 sowie ein weiterer im unteren Bereich des Gels bei pH 4,2. Der Spot im mittleren Gelbereich konnte auch in den Versuchen, bei denen denaturiertes SLK über Nacht mit TLN inkubiert wurde, gefunden werden. Und auch in der Peptidkarte nach einer Fokussierzeit von 11000 Vh war ein Spot in dieser Lage erkennbar. Dies deutet daraufhin, dass es sich hierbei um das SLK-Hydrolysefragment mit einer Molmasse von ca. 29 kDa handelt (erkennbare Bande in Bahn 7, Abbildung 34).

Im Vergleich zu den anderen Peptidkarten ist die Auftrennung von denaturiertem und mit TLN behandeltem Rinder-SLK für eine zweidimensionale Auftrennung unzureichend. Es sind zu wenige Spots und damit eventuelle Fragmente im Gel erkennbar, die eine eindeutige Identifizierung ermöglichen würden.

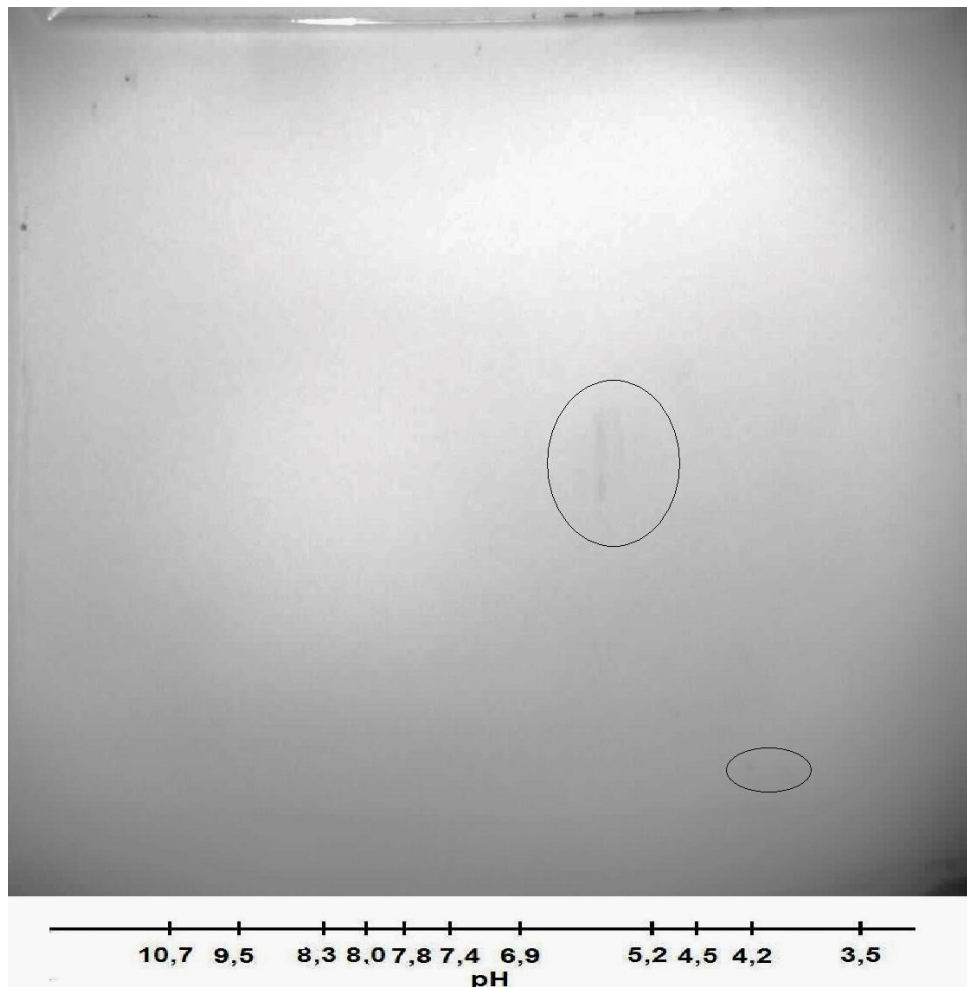


Abbildung 40: Durch TLN gespaltene Fragmente von denaturiertem Kollagen (4 μ l Auftragsvolumen, Coomassie)

Natives SLK

In Abbildung 41, 42 und 43 sind die Peptidkarten der Hydrolysefragmente aus den enzymatischen Spaltungen von nativen Rinder-SLK dargestellt. Die Spots in den 2D-Gelbildern unter denaturierten Bedingungen waren zum Teil sehr schwach ausgebildet. Aus diesem Grund wurde das Probenvolumen erhöht. Diesbezüglich bewährten sich 10 μ l des klaren Überstandes der Proben.

Im 2D-Gel des mit Kollagenase gespaltenen nativen Kollagens (Abb. 41) sind viele, zum Teil sehr kleine Spots erkennbar. Diese sind im gesamten 2D-Gel verteilt zu finden. Das Gel wurde zur Verstärkung einzelner Spots nach der Coomassie-Färbung mit Silber gefärbt (Anhang, Abb. 53). Aufgrund der Empfindlichkeit der Silberfärbung ist eine Beschreibung der Spots wegen der zu starken Hintergrundfärbung nicht sinnvoll. Das unter Coomassie gefärbte 2D-Gel ist in Abbildung 41 dargestellt. Es sind ebenfalls wie unter denaturierten Bedingungen im pH-Bereich von ca. 4,5 bis 5,2 Spots zu erkennen. Da für die enzymatische

Spaltung nur eine geringe Enzymkonzentration benötigt wird, ist auszuschließen, dass es sich hierbei um Spots des Enzyms selbst handelt (Peptidkarte von reiner Kollagenase ist im Anhang, Abb. 54 abgebildet).

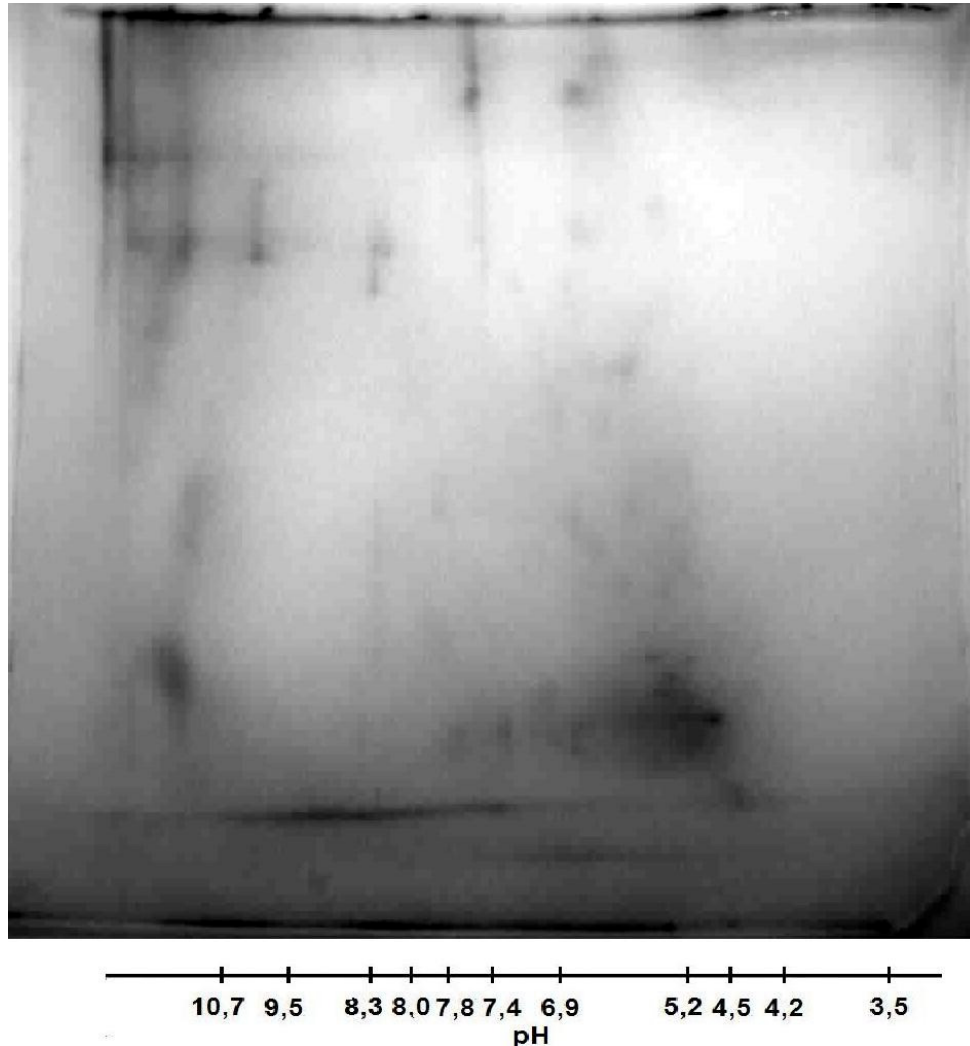


Abbildung 41: Durch Kollagenase gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (10 μ l Auftragsvolumen, Coomassie)

Das mit Coomassie gefärbte Gel von Kollagenpeptiden aus der Spaltung mit α -Chymotrypsin zeigte keine bzw. nur sehr schwache Spots und war daher für eine Beschreibung nicht geeignet. Darum wurde das Gel ebenfalls im Anschluss mit Silber gefärbt (Abb. 41). Innerhalb des Gels sind im Vergleich zu den Peptidkarten aus Kollagenase-Behandlung und TLN-Behandlung nur Fragmente erkennbar, welche in einem engen pH Bereich von 4,5 und 5,2 liegen. Weiterhin ist eine starke Hintergrundfärbung im oberen Bereich der Trennung erkennbar. Es ist zu vermuten, dass viel ungespaltenes SLK zu dieser starken Färbung geführt hat (Spur 2 in Abbildung 34). Weiterhin sind in mittlerer Höhe des Gels (pH 5,2) drei dicht beieinander liegender Spots stark ausgeprägt.

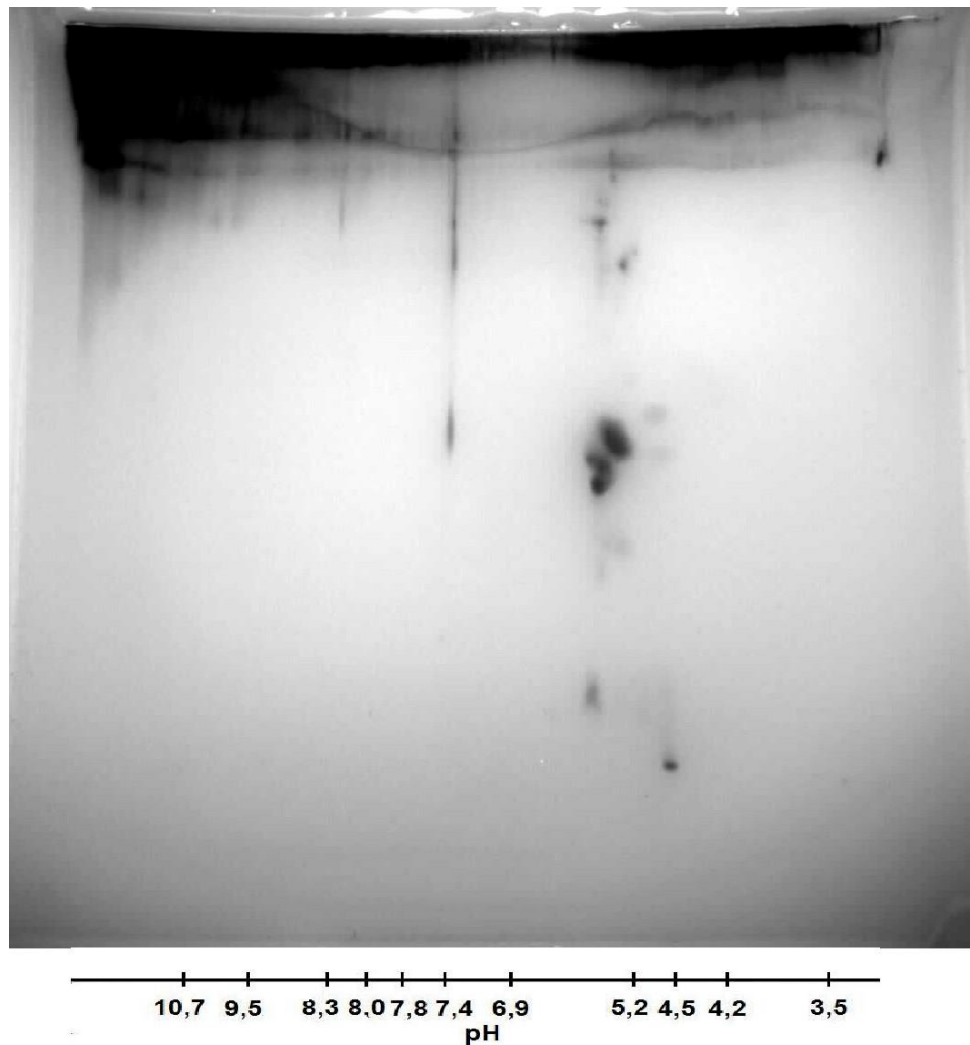


Abbildung 42: Durch α -Chymotrypsin gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (10 μ l Auftragsvolumen, Silberfärbung)

Im 2D-Gelbild von TLN-behandeltem nativem Kollagen (Abb. 43) sind besonders gut ausgeprägte und über die Peptidkarte verteilte Spots erkennbar. Es sind Fragmente mit unterschiedlichen pI-Werten und Molmassen vorhanden und charakterisierbar. Die erkennbaren Spots verteilen sich ab einem pH von 4,5 bis hin zum alkalischen Bereich.

Es ist zu erkennen, dass im mittleren Gelbereich (pH 7,4, 7,8) eine vom IPG-Streifen in das Gel hineinlaufende Verschmierung erkennbar ist (Abb. 43). Dies deutet auf ein Übergangsproblem hin. Verstärkt wird dieser Effekt durch Erhöhung der Konzentration. Vermutlich beeinflusst ein möglicher Kristallisationseffekt (Kapitel 4.2) in diesem Bereich des IPG-Streifens die Übertragung in das Gel.

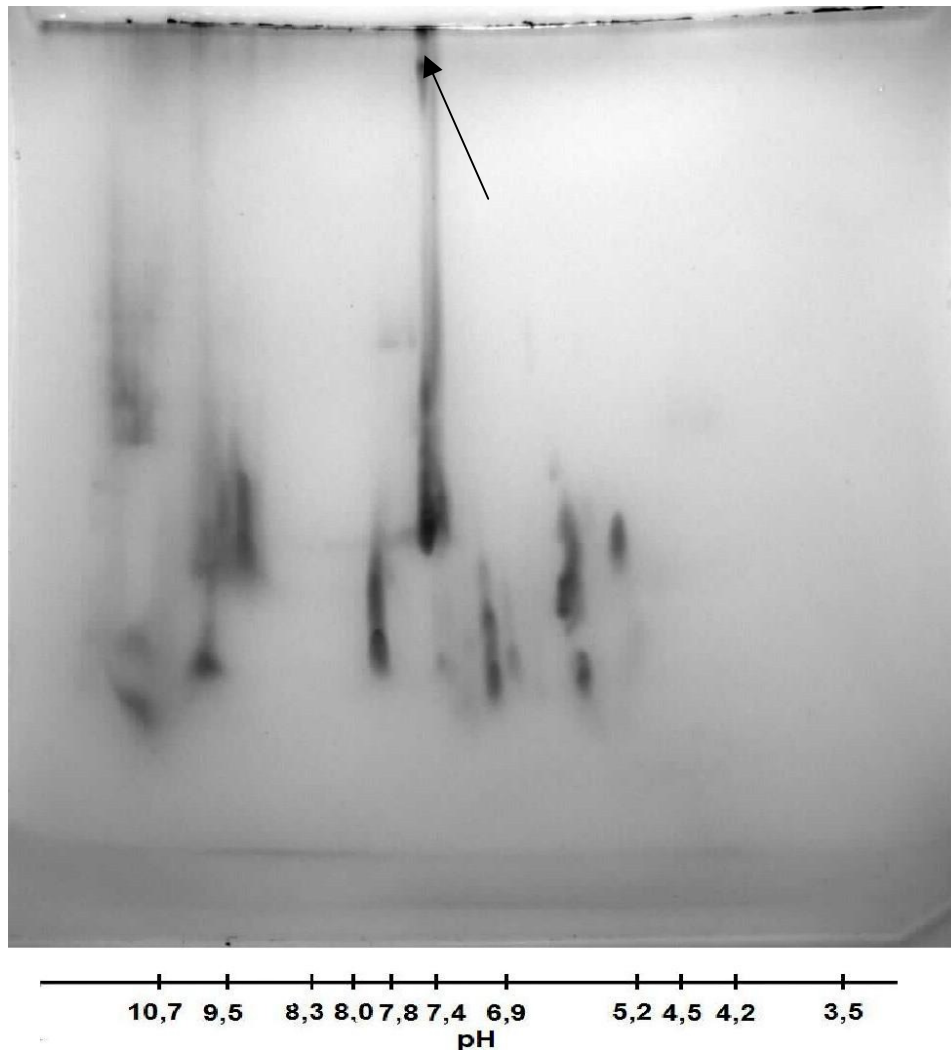


Abbildung 43: Durch TLN gesplante Fragmente von nativem Kollagen (10 μ l Auftragsvolumen, Coomassie)

Aufgrund stark ausgeprägter Färbung dicht beieinander liegender Spots ist es nur unzureichend möglich, diese zu beschreiben. Aus diesem Grund wurde das Probenvolumen halbiert und eine weitere Peptidkarte zum Vergleich erstellt (Abb. 44).

Es ist zu erkennen, dass die Spots nicht mehr so stark wie in Abbildung 43 gefärbt sind. Weiterhin ist eine Differenzierung des Spots bei pI 7,8 (7,4) möglich. Diesbezüglich sind vier mögliche Fragmente erkennbar. Diese liegen sehr dicht in einem engen pH-Bereich. Aufgrund der weiteren Auftrennung nach der Molmasse sind diese jedoch gut erkennbar. Die von dem Fragment ausgehende Verschmierung (Abb. 43) ist nicht zu erkennen. Deshalb empfiehlt sich bei der zweidimensionalen Auftrennung von TLN-Kollagenfragmenten ein geringeres Probenvolumen als 10 μ l.

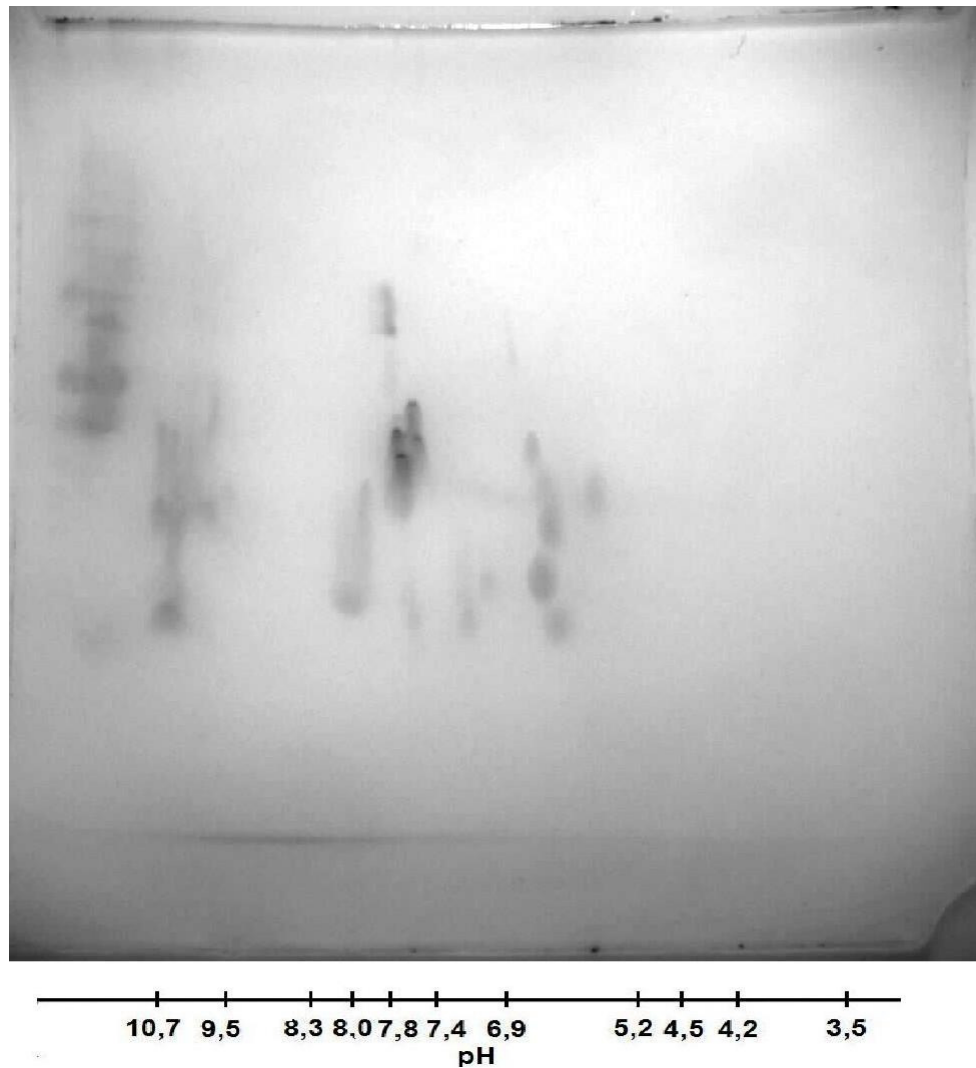


Abbildung 44: Durch TLN gespaltene Fragmente von nativem Kollagen (5 μ l Auftragsvolumen, Coomassie)

4.4.3 Enzymatische Spaltung verschiedener Kollagentypen

Für eine mögliche Charakterisierung der Kollagentypen I und III anhand der zweidimensionalen elektrophoretischen Auftrennung ihrer spezifischen Fragmente, wurden kommerzielle Standards enzymatisch gespalten. Ausgehend von den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Versuchen und aufgrund der gut auswertbaren Peptidkarten nach Inkubation mit TLN (Abb. 43 und 44), erfolgte die Spaltung mit TLN für 4 Stunden bei 37 °C. Die Proben wurden zuerst nach der Molmasse aufgetrennt (Abb. 45, Bahn 1 und 2). Die Auftrennung erfolgte in einem neutralen PA-Gel. Die in Spur 1 und 2 erkennbaren Banden in Höhe von 116 kDa lassen vermuten, dass es sich hierbei um die α_1 - und α_2 -Banden des Typ I-Kollagens handelt. Im Vergleich zu Abbildung 35 (Bahn 5) sind in den Spuren lediglich Banden in Höhe von 29 kDa erkennbar, was auf eine geringere Spaltausbeute hindeutet.

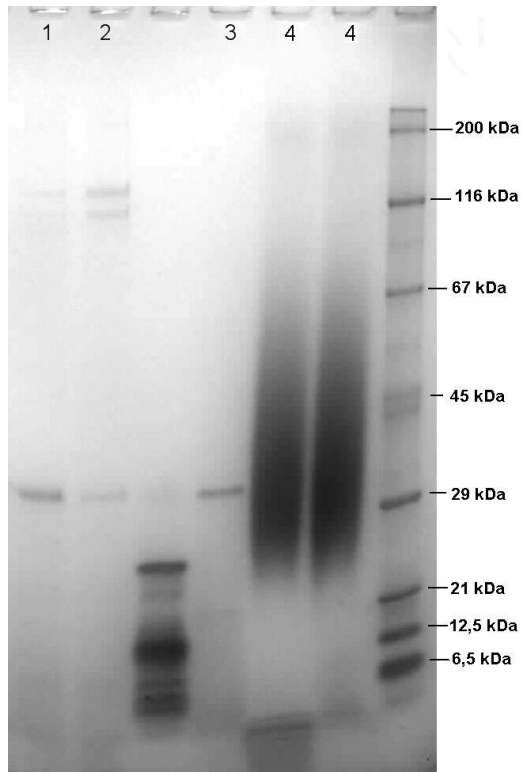


Abbildung 45: Darstellung eventueller Spaltfragmente aus der Spaltung mit TLN (*Spur 1:* Kollagenstandard-Typ III-Spaltung; *Spur 2:* Kollagenstandard-Typ I-Spaltung; *Spur 3:* denatur. SLK-Spaltung; *Spur 4:* TLN)

Das Gelbild der zweidimensionalen Auftrennung des mit TLN inkubierten Typ I-Standards war für eine nähere Beschreibung nicht geeignet (Anhang, Abb. 55). Im Falle der Silberfärbung war ein Erkennen möglicher Fragmente aufgrund starker Hintergrundfärbung nicht möglich.

In Abbildung 46 ist die Peptidkarte des mit TLN inkubierten Typ III-Kollagens dargestellt. Um mögliche Fragmente besser beschreiben zu können, wurde ein globulärer Molmassenstandard mit aufgetragen. Dieser ist jedoch während der Elektrophorese aus der gegossenen Probenflasche in das Gel gelaufen. Durch den Massenstandard und der vermutlich hohen Mengen an ungespaltenem SLK (Abb. 45, α -Banden) sind weite Teile des Gels im oberen Bereich auf Höhe der 116 kDa stark mit Silber gefärbt.

Neben Verunreinigungen (weiß umrandet) sind mögliche Kollagen-Peptide im Gel markiert. Die rote Markierung (Spot) könnte auf ein mögliches Kollagenfragment hindeuten, vergleichbar mit den Banden in Abbildung 45 in Höhe von 29 kDa. Eine Zuordnung von Fragmenten des Typ I bzw. Typ III ist aber nicht möglich, da der kommerzielle Typ III-Kollagenstandard noch Restspuren von Typ I aufweist. Diesbezüglich ist auch keine eindeutige Zuordnung von Kollagenfragmenten des Typ I mit Hilfe der Peptidkarte in Abbildung 55 (Anhang) möglich. Auch frühere Kollagenstandardspaltungen (Typ I und III) mit

TLN lieferten Peptidkarten, die ebenfalls keine Zuordnung der Kollagenfragmente ermöglichten.

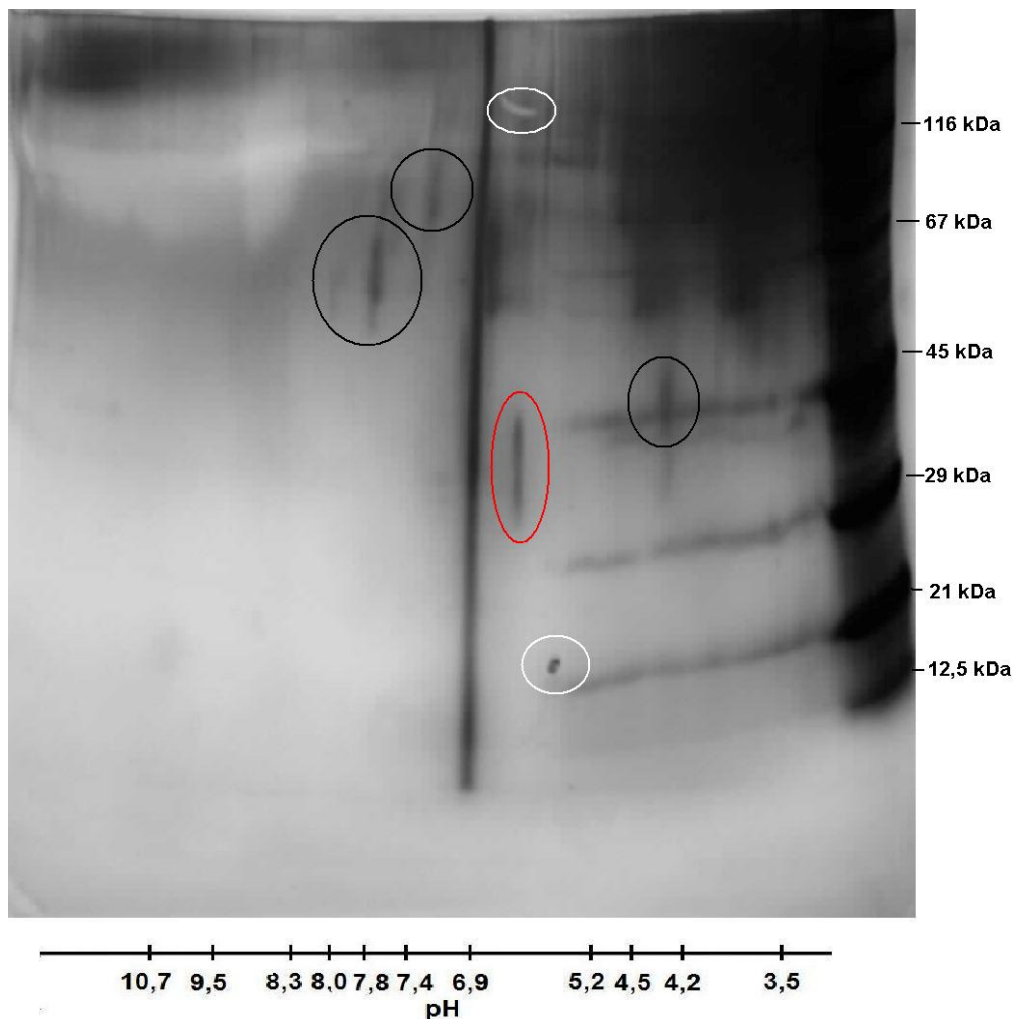


Abbildung 46: Durch TLN gespaltene Fragmente von kommerziellen Typ III-Kollagen. Markiert sind Spots, welche auf Verunreinigungen (weiß umrandet) und mögliche Kollagenfragmente hindeuten (40 µl Auftragsvolumen, Silberfärbung).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe von enzymatischen Spaltungen von kommerziellen Kollagenstandards keine spezifischen Peptidmuster erstellt werden, die eine Zuordnung bzw. Identifizierung von Kollagentypen ermöglichten. Für weiterführende Versuche empfiehlt es sich mit Hilfe von fraktionierten Salzfällungen die Kollagentypen aus boviner Haut zu separieren und anschließend enzymatisch zu spalten. Anschließend sollten Peptidkarten erstellt werden, mit dessen Hilfe eine Zuordnung der Kollagenfragmente in den in Kapitel 4.4.2 dargestellten 2D-Gelen möglich wird. Alternativ könnten auch andere kommerzielle Kollagenstandards verwendet werden.

4.4 Densitometrische Auswertung der Peptidkarten

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht darin, zu untersuchen, inwieweit die Peptidkarten densitometrisch zur Quantifizierung von Kollagentypen in einem Probengemisch ausgewertet werden können.

Bei Densitometern handelt es sich um Fotometer, die Elektrophorese-Trennspuren abtasten. Dabei werden der Rf-Wert (relative Laufstrecke) und die Extinktion (Lichtabsorption) der einzelnen Zonen gemessen. Als Ergebnis erhält man ein Densitogramm (Kurvendiagramm). In Kapitel 4.4.1 wurden bereits Banden densitometrisch ausgewertet, um die Intensität einzelner Banden genauer zu bestimmen. Zur Quantifizierung werden die Flächen unter den Kurven verwendet [Westermeier, 1990].

Die Durchführung der Densitometrie erfolgte zum einen mit Hilfe der Gene Tools Analysensoftware (SYNGENE), zum anderen mit der Analysensoftware Progenesis SameSpots (nonlinear DYNAMICS). Als Peptidkarte wurde die zweidimensionale Auftrennung der TLN-Spaltfragmente von nativem Kollagen verwendet. Bei dieser Peptidkarte ist eine überschaubare Anzahl von Spots erkennbar.

Die Analysensoftware Gene Tools ist für eindimensionale Gele konzipiert. Deshalb wird das Gel in einzelne Spuren (tracks) aufgeteilt. Innerhalb der Spuren erfolgt die Identifizierung der einzelnen Banden. Für die Auswertung stehen verschiedene Integrationsmethoden zur Verfügung. In Abbildung 47 ist die Aufteilung des Gels in Spuren nach den für die Software erkannten Banden dargestellt. Insgesamt wurden 16 Spuren erfasst. Die identifizierten Banden sind mit einer gelben Basislinie gekennzeichnet. Für eine quantitative Analyse wurden die in der Abbildung 47 mit einem Pfeil gekennzeichneten Spots in Betracht gezogen. Es ist ersichtlich, dass diese unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Weiterhin liegen diese gut in den Spuren, wodurch ein guter Vergleich möglich wird.

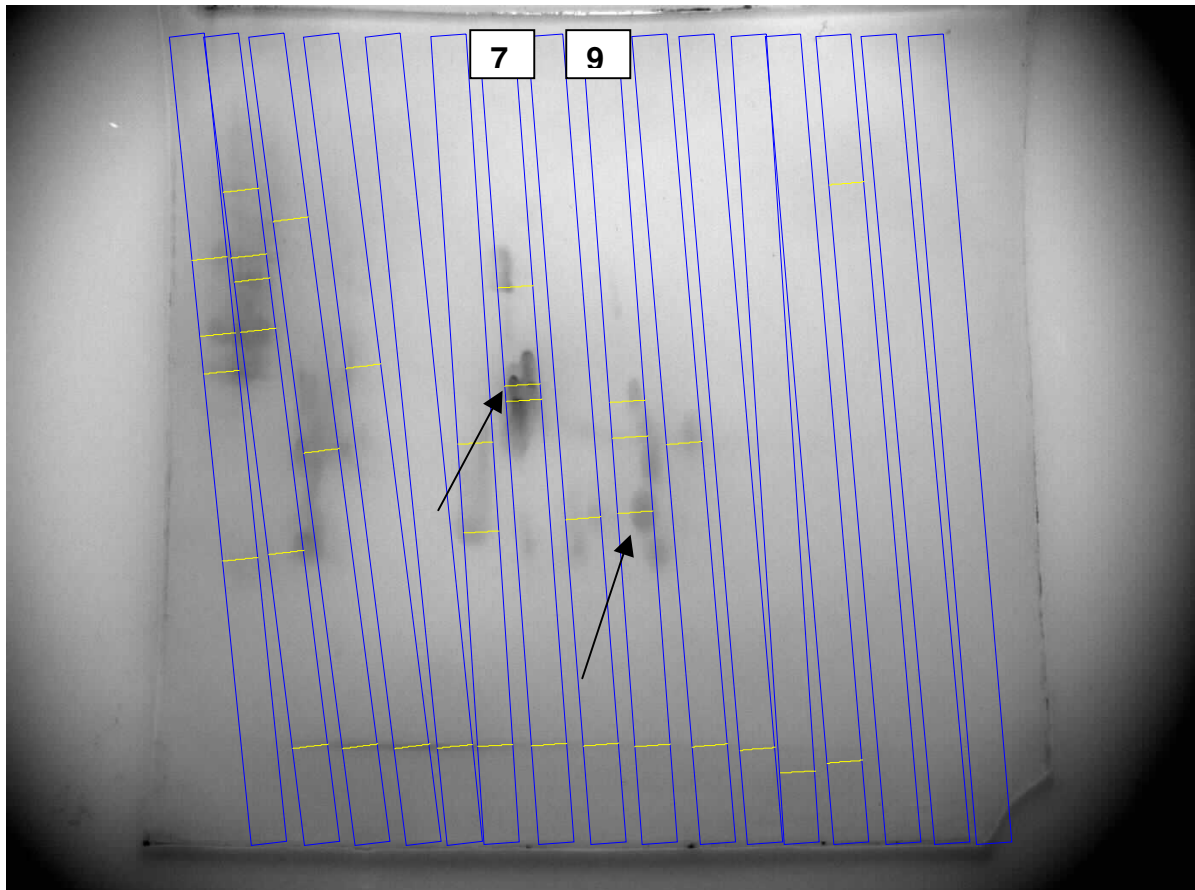
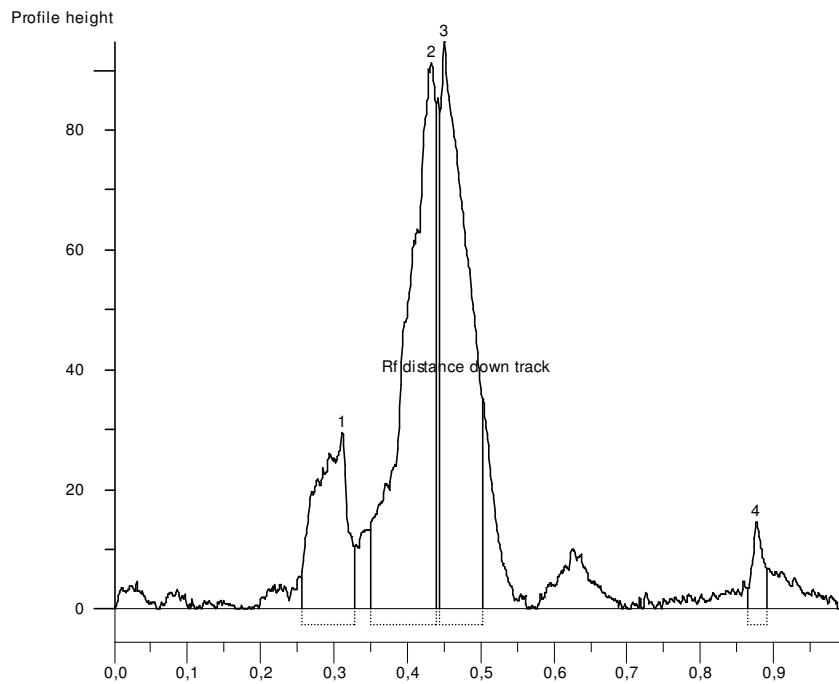


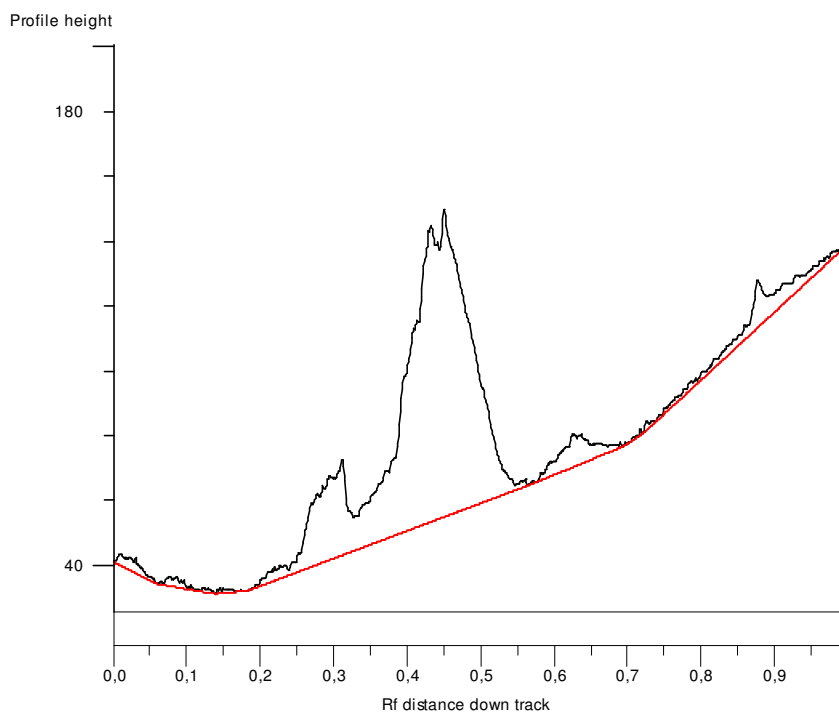
Abbildung 47: Aufteilung einer von mit TLN gespaltenem nativem Kollagen erhaltenen Peptidkarte nach Spuren (Gene Tools). Die identifizierten Banden sind mit einer gelben Basislinie gekennzeichnet. Die für die quantitative Analyse verglichenen Spots sind mit einem Pfeil markiert (Spur 7, Nr. 2; Spur 9, Nr. 2).

Die sich für die Spur 7 ergebenden Densitogramme sind in Abbildung 48 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Profilhöhe der Peaks (Spitzenwerte) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die relative Laufstrecke (R_f) aufgetragen.

Der Hintergrund der Gele, vor allem bei Gradienten-Gelen, verläuft nicht konstant. Aus diesem Grund muss dieser richtig bestimmt werden, da die Fläche eines Peaks bis zur Basislinie heruntergerechnet wird. In Abbildung 48 A wird eine einfache horizontale Basislinie benutzt, wodurch hohe Fehlerwerte entstehen können. Aus diesem Grund erfasst die Software üblicherweise die steigende Hintergrundfärbung (Abb. 48 B). Damit wird ein realer Peakflächenwert mit höherer Wahrscheinlichkeit erreicht.



A



B

Abbildung 48: Densitogramme der Spur 7 aus Abbildung 47. (A) Die horizontale Basislinie berücksichtigt nicht den aufsteigenden Hintergrund in der Färbung. (B) Die korrigierte Basislinie berücksichtigt die steigende Hintergrundfärbung.

Die Ergebnisse der Analyse der Spots bzw. Banden (Spur 7, Nr. 2; Spur 9, Nr. 2) sind in Tabelle 15 abgebildet. Da die Spots in Spur 7 sehr eng beieinander liegen, sind die Ergebnisse von Nr. 2 und Nr. 3 zur Vollständigkeit mit aufgelistet.

Tabelle 15: Ergebnisse der Analyse der Spots mit Gene Tools

Nummer	Peakhöhe	Peakfläche
7/2	91,21	171 814
7/3	94,82	158 306
9/2	25,80	24 136

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bande in Spur 9 im Vergleich zur Bande in Spur 7 eine deutlich geringere Peakfläche besitzt. Weiterhin ist eine Auswertung eng beieinander liegender Spots mittels dieser densitometrischen Auswertung ungenügend.

Wie bereits erwähnt, ist die verwendete Software für eindimensionale Gele konzipiert und beschränkt sich auf die Analyse von Banden. Für eine genauere Charakterisierung der Spots ist eine Analysensoftware für 2D-Gele von Vorteil. Dazu wurde die Analysensoftware Progenesis SameSpots verwendet. Die Identifizierung der Spots zu der Peptidkarte aus Abbildung 44 ist nachfolgend dargestellt (Abb. 49).

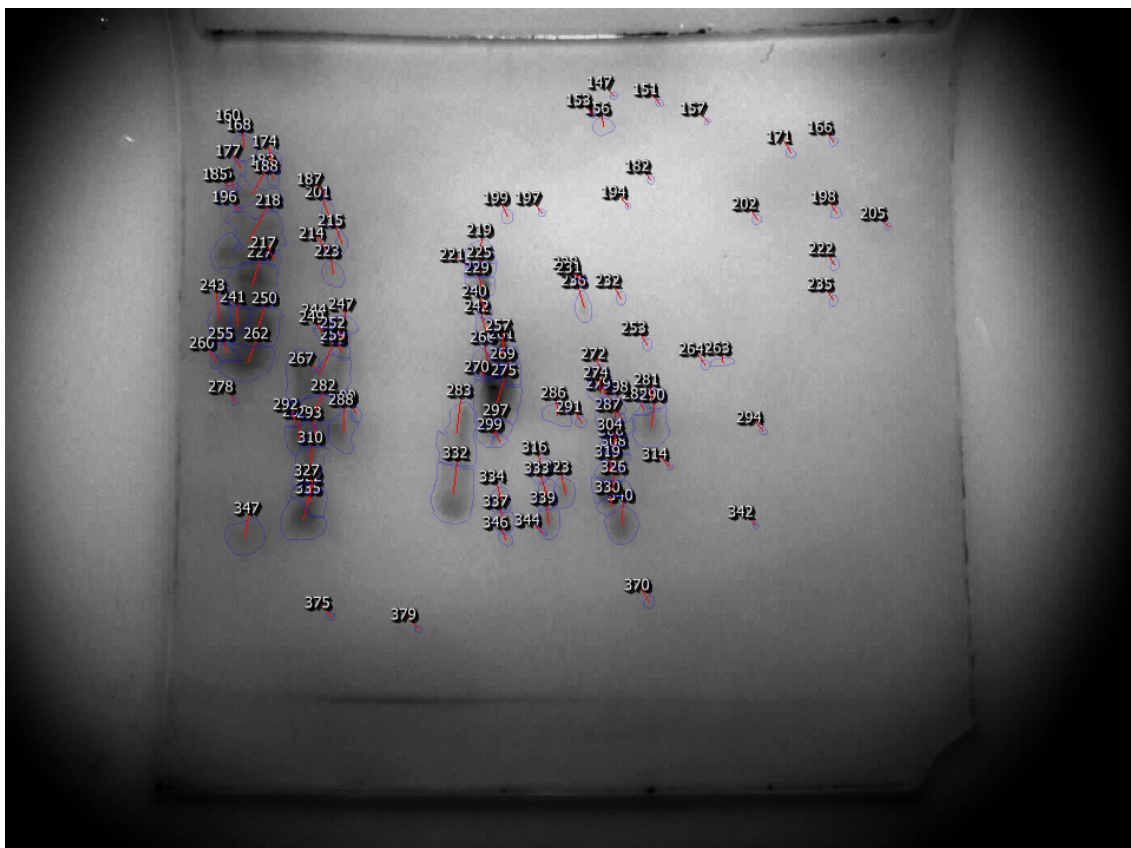
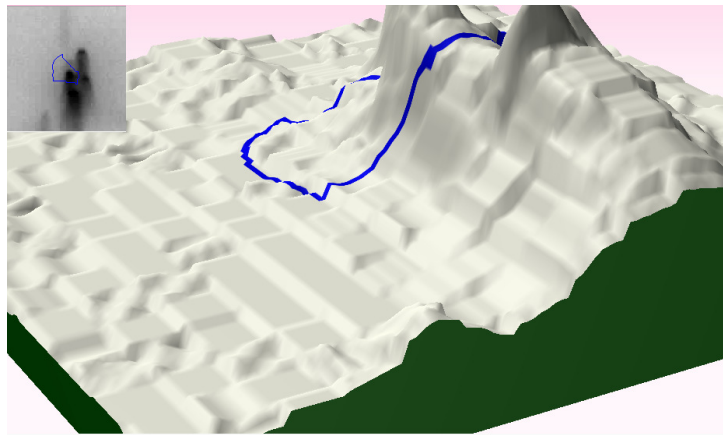
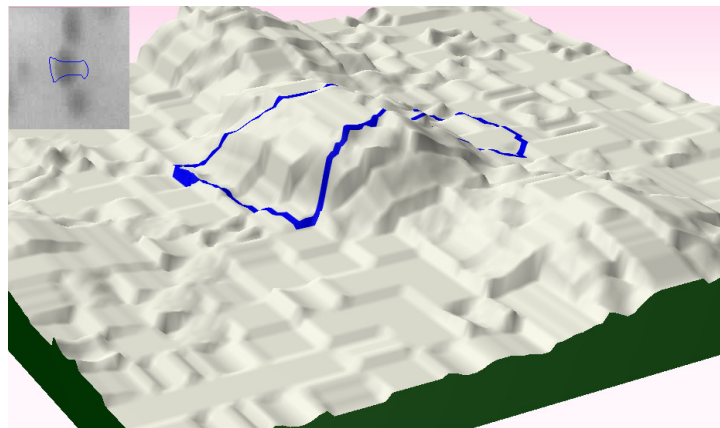


Abbildung 49: Spoterkennung durch Progenesis SameSpots

Mit Hilfe der Software können einzelnen Spots direkt identifiziert und analysiert werden. Dadurch ist ein genauerer Vergleich möglich. Diesbezüglich wurden die Spots Nr. 326 und Nr. 266 näher betrachtet. Sogar eine dreidimensionale Betrachtung ist möglich (Abb. 50).



A



B

Abbildung 50: 3D-Ansicht einzelner Spots aus Abbildung 48 (Progenesis SameSpots) (A) Spot-Nr. 266 (B) Spot-Nr. 326

Die sich aus dem Densitogramm ergebenden Kennwerte der beiden Spots sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Ergebnisse der Analyse der Spots mit Progenesis SameSpots

Nummer	Peakhöhe	Peakfläche
266	115	35 423
326	53	29 486

Mit dieser Spotanalyse ist zu erkennen, dass die Peakhöhe des Spots Nr. 266 wesentlich höher ist. Jedoch sind die Spots bezüglich der Peakflächen nicht sehr voneinander entfernt, aufgrund der größeren Fläche des Spots Nr. 326.

Quantifizierung

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine densitometrische Auswertung der Gele möglich ist und somit die Möglichkeit einer Quantifizierung gegeben ist. Jedoch ist zu beachten, dass jedes Protein eine unterschiedliche Affinität zu einem Farbstoff hat. Durch das Verwenden von Markerproteinen kann bestimmt werden, welche Menge von welchem Protein in die Trennung eingebracht wurde. So können durch das Absorptionsverhältnis Rückschlüsse auf die Konzentration des Spots gezogen werden. Für die nachfolgend aufgeführten Proteine wurden bereits Berechnungen der Einwaage pro gemessener und integrierter Peakfläche durchgeführt [Westermeier 1990]:

Lactalbumin	138 µg/ Peakfläche
Trypsin-Inhibitor	133 µg/ Peakfläche
Ovalbumin	122 µg/ Peakfläche
Carboanhydrase	108 µg/ Peakfläche
Phosphorylase B	60 µg/ Peakfläche
BSA	57 µg/ Peakfläche

Analog kann durch die Erfassung von Kollagentypen als Reinsubstanz eine Vergleichsmessung durchgeführt werden, um so genau die Menge an Kollagentypen in einem Probengemisch zu erfassen. Voraussetzung zur Quantifizierung ist eine spezifische Typ-Identifizierung der Hydrolysefragmente.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der Probe während der zweiten Dimension im Gel des pH-Gradienten zurückbleibt. Dadurch ist eine genaue Quantifizierung zusätzlich mit Fehlern behaftet.

Problematisch wird die Quantifizierung enzymatisch gespaltener Kollagentypen. Aufgrund des vorhandenen Salzes im Puffer wird eine genaue Erfassung der Auftragsmenge schwierig.

Für die Auswertung der 2D-Gele ist die Analysensoftware Gene Tool ungenügend. Um genaue Quantifizierungen vorzunehmen bedarf es spezieller Auswertesysteme.

Nach Kalibrierung mit Markerproteinen wird es weiterhin möglich, mit Hilfe der Software Progenesis SameSpots, den Rf-Werten automatisch Molmasse bzw. pI zuzuordnen.

5 Zusammenfassung

Kollagenes Gewebe findet verstärkt Anwendung als Biomaterial, beispielsweise für die Zellkultivierung. Dadurch ist eine Charakterisierung verschiedener Kollagentypen erforderlich. Viele Analysen, wie Doppel-SDS-PAGE oder Westernblot bzw. chromatografische Trennmethode sind oft sehr aufwendig. Weiterhin ist eine fraktionierte Salzfällung zur Trennung einzelner Kollagentypen notwendig.

Ziel dieser Arbeit war daher mit Hilfe von Peptidkarten eine Methode zu entwickeln, die eine Identifizierung von Kollagentypen in einer Gewebeprobe ermöglicht. Diesbezüglich wurde untersucht, inwieweit Kollagenfragmente (Kollagenpeptide) durch Kombination von IEF und SDS-PAGE elektrophoretisch (2D-Gelelektrophorese) aufgetrennt werden können.

Für das Erstellen derartiger Peptidkarten wurde das als Probe verwendete Rinder-SLK gespalten. Zum einen erfolgte die Spaltung mit BrCN, zum anderen mit Hilfe spezieller Enzyme. Dementsprechend wurden α -Chymotrypsin, mikrobielle Kollagenase und TLN verwendet.

Es zeigte sich, dass sowohl Kollagen-BrCN-Peptide als auch enzymatisch gespaltene Kollagenfragmente zweidimensional aufgetrennt werden können. Die Bestimmung der richtigen Probenmenge sowie geeigneter Fokussierungsbedingungen während der IEF sind dabei entscheidende Parameter um optimale Peptidkarten zu erstellen, welche eine Charakterisierung von Kollagentypen ermöglichen.

Mit der Verwendung von IPG-Streifen 6-10 für die erste Dimension und 12 %igen PA-Gelen für die zweite Dimension konnten charakterisierbare Peptidkarten von gespaltenem SLK durch BrCN erstellt werden. Die Fokussierung der Streifen erfolgte mit ca. 1370 Vh. Mit Hilfe eines Kollagenstandards des Typ III erfolgte innerhalb einer Peptidkarte die Zuordnung von charakteristischen Kollagen-BrCN-Peptiden des Typ I- und Typ III-Kollagens. Ausgehend von der Lage der Spots im 2D-Gel erfolgte weiterhin eine Zuordnung der Hydrolysefragmente des durch BrCN gespaltenen und zweidimensional aufgetrennten Rinder-SLK. Dabei wurden Kollagenpeptide des Typ I-Kollagens identifiziert. Weiterhin ist zu vermuten, dass es sich bei einem Spot um das CB 8 der α_1 -Polypeptidkette des Typ III-Kollagens handelt, wodurch gezeigt wird, dass mit den BrCN-Peptiden eine Typ-Identifizierung möglich ist.

Die Ergebnisse der enzymatischen Kollagenspaltung verdeutlichten, dass mikrobielle Kollagenase die α -Banden des SLKs bei 37°C im Vergleich zu α -Chymotrypsin bzw. TLN besser gespalten hat. Bei einer Reaktionszeit von 4 Stunden wurde ein 70 %iger Abbaugrad

des SLKs durch Kollagenase ermittelt sowie ein 39 %iger Abbaugrad durch TLN bzw. 12 % durch α -Chymotrypsin. Mit zunehmender Reaktionszeit wird bei Kollagenase und α -Chymotrypsin keine wesentliche Zunahme des Abbaus von SLK beobachtet. Lediglich bei TLN war eine steigende Zunahme des Abbaugrades in Abhängigkeit der Zeit zu erkennen (über 50 % bei 16 stündiger Reaktionszeit).

Mit der Verwendung von IPG-Streifen 3-10 für die erste Dimension und 8-16 %igen PAGelen für die zweite Dimension konnten Peptidkarten von enzymatisch gespaltenem SLK erstellt werden. Die Fokussierung der Streifen erfolgte mit ca. 6600 Vh. In allen erstellten Peptidkarten des enzymatisch gespaltenen SLKs waren Spots erkennbar, welche sich in Lage, Anzahl und Färbung unterscheiden. Dabei waren gut charakterisierbare Spots in den Peptidkarten von nativ gespaltenem SLK durch Kollagenase und TLN unter Coomassie-Färbung zu erkennen. Die Peptidkarten des aufgetrennten SLKs nach Inkubation mit α -Chymotrypsin waren erst nach Silberfärbung beschreibbar. Es zeigte sich, dass aufgrund der Empfindlichkeit der Silberfärbung gering konzentrierte Peptide, welche unter Coomassie nicht zu erkennen waren, gefärbt wurden. Gleichzeitig war eine Charakterisierung dieser Peptidkarten durch starke Hintergrundfärbung unzureichend möglich.

Eine Identifizierung der Typen I und III anhand spezifischer Hydrolysefragmente war jedoch nicht möglich. Die durchgeführten Spaltungen von kommerziellen Kollagenstandards mit TLN ermöglichten keine Zuordnungen von Typ I- und Typ III-Kollagenfragmenten.

Weiterhin zeigte sich, dass eine densitometrische Auswertung der 2D-Gele mit geeigneter Analysensoftware möglich ist.

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass eine Identifizierung von Kollagentypen mit Hilfe von zweidimensional aufgetrennten Kollagen-BrCN-Peptiden möglich ist. Es wurde gezeigt, dass sowohl eine Auftrennung der Peptide nach pI als auch nach Molmasse stattgefunden hatte. Weiterhin wurden verschiedenen Peptidkarten von Hydrolysefragmenten aus enzymatischen Spaltungen des SLKs erstellt. Jedoch ist es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, anhand dieser, Kollagentypen zu identifizieren.

6 **Ausblick**

Im Rahmen dieser entwickelten Methode wird es möglich, charakterisierbare Peptidkarten von gespaltenem SLK sowohl durch spezielle Enzyme als auch durch BrCN zu erstellen. Anhand der erstellten 2D-Gele von Kollagen-BrCN-Peptiden kann eine Zuordnung von Kollagenfragmenten des Typ I und III erfolgen.

Für weitere Anwendungen des „Peptide Mappings“ zum Identifizieren von Kollagentypen empfiehlt es sich gewisse Parameter zu optimieren. Beispielsweise kann die Laufstrecke des Sammelgels in der zweiten Dimension vergrößert werden, indem der IPG-Streifen auf bereits erstarrte Agarose gesetzt wird, um anschließend fixiert zu werden. Restspuren von Öl könnten möglicherweise eine Störung des Übergangs der Probe vom Streifen in das 2D-Gel zur Folge haben, wodurch untersucht werden kann, ob während der IEF eine erfolgreiche Fokussierung auch ohne Silikonöl stattfindet. Weiterhin könnte der Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer bei der enzymatischen Spaltung des SLKs durch einen Tris-Essigsäure-Puffer ersetzt werden, da noch in der Diskussion steht, inwieweit das Salz im IPG-Streifen Probleme beim Übergang der Probe verursacht.

Durch einen anderen Probenauftrag (cup loading) könnte einer starken horizontalen Verschmierung, besonders von BrCN-Peptiden bei geringen Voltstunden entgegengewirkt werden.

Alternativ könnten die Typen I und III mit Hilfe von fraktionierten Salzfällungen aus boviner Haut (neutralsalzlösliches Kollagen) separiert und enzymatisch gespalten werden, damit eine Zuordnung der Hydrolysefragmente der erstellten Peptidkarten erfolgen kann. Diesbezüglich könnten auch andere kommerzielle Kollagenstandards verwendet werden. Des Weiteren empfiehlt es sich, Peptidkarten von enzymatisch gespaltenem Kollagen vom Typ II zu erstellen.

Damit wäre dann zukünftig die Analyse von Kollagentypen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese auch für andere Gewebearten möglich, beispielsweise Knorpel- und Knochengewebe.

7 Anhang

IPG-Streifen

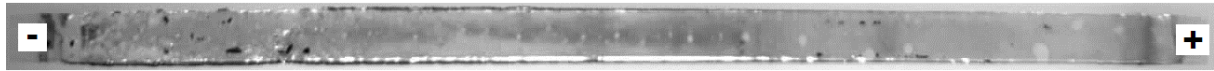


Abbildung 51: Coomassie gefärbte IPG-Streifen 6-10 nach der Fokussierung mit 1370 Vh von BrCN gespaltenem SLK (Abb. 27)



Abbildung 52: Coomassie gefärbte IPG-Streifen von 3-10 nach der Fokussierung mit 6600 Vh. (A) Durch α -Chymotrypsin gespaltenes natives SLK. (B) durch Kollagenase gespaltenes natives SLK. (C) Durch TLN gespaltenes SLK.

Peptidkarten

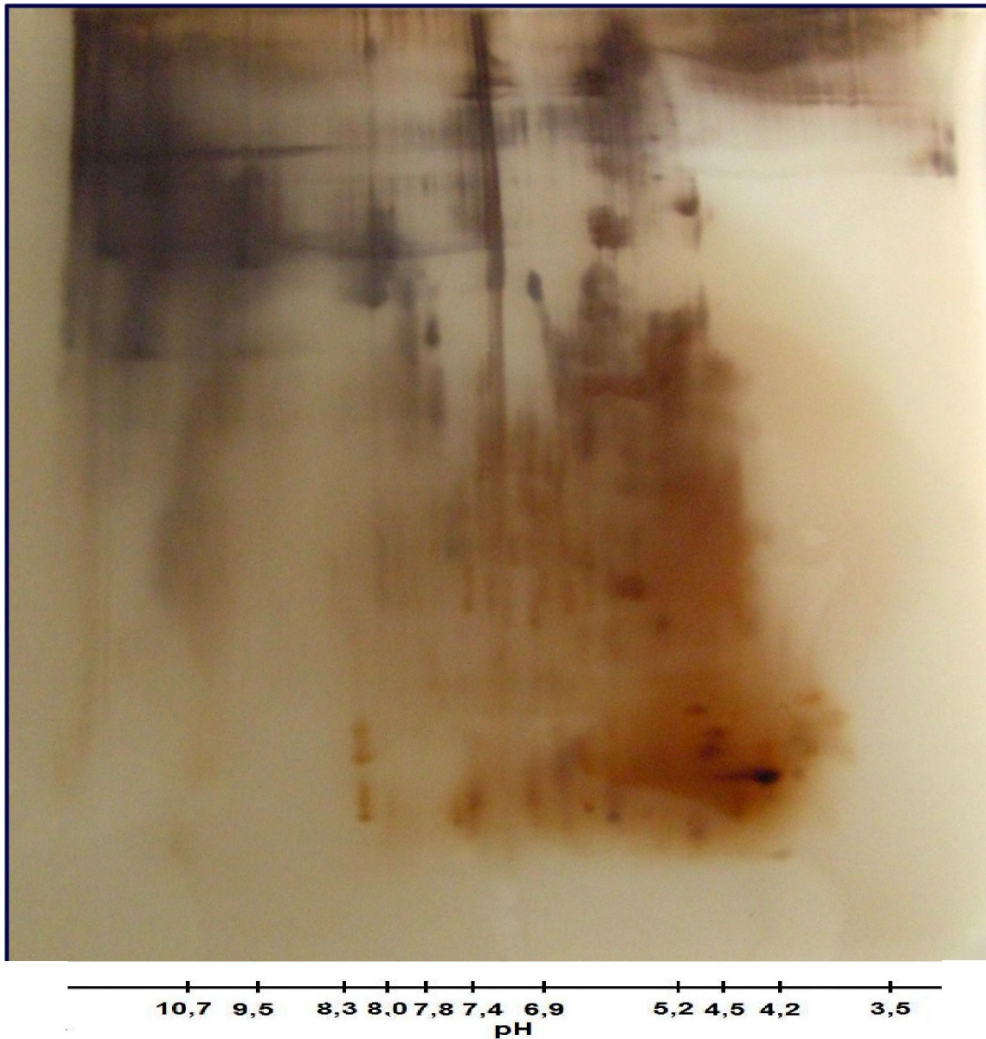


Abbildung 53: Peptidkarte von Kollagenase gespaltenem SLK: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10 und 6600 Vh sowie mit einem 8-16 %igem PAG in der zweiten Dimension (10 µl Auftragsvolumen, Silberfärbung).

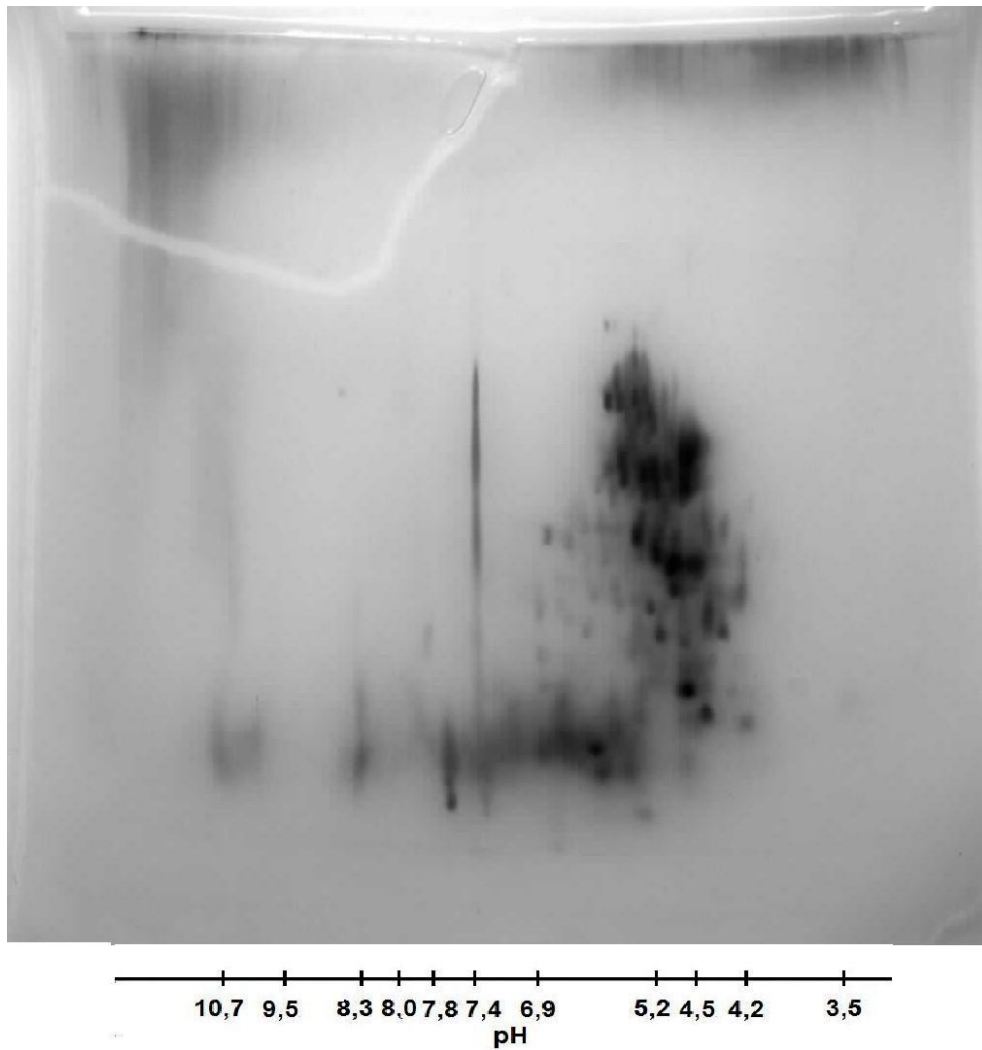


Abbildung 54: Peptidkarte einer zweidimensionalen Auftrennung von Kollagenase: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10 und 6600 Vh sowie mit einem 8-16 %igem PAG in der zweiten Dimension (Auftragsmenge: ca. 5-fach höher als bei enzymatischer Spaltung von SLK, Silberfärbung).

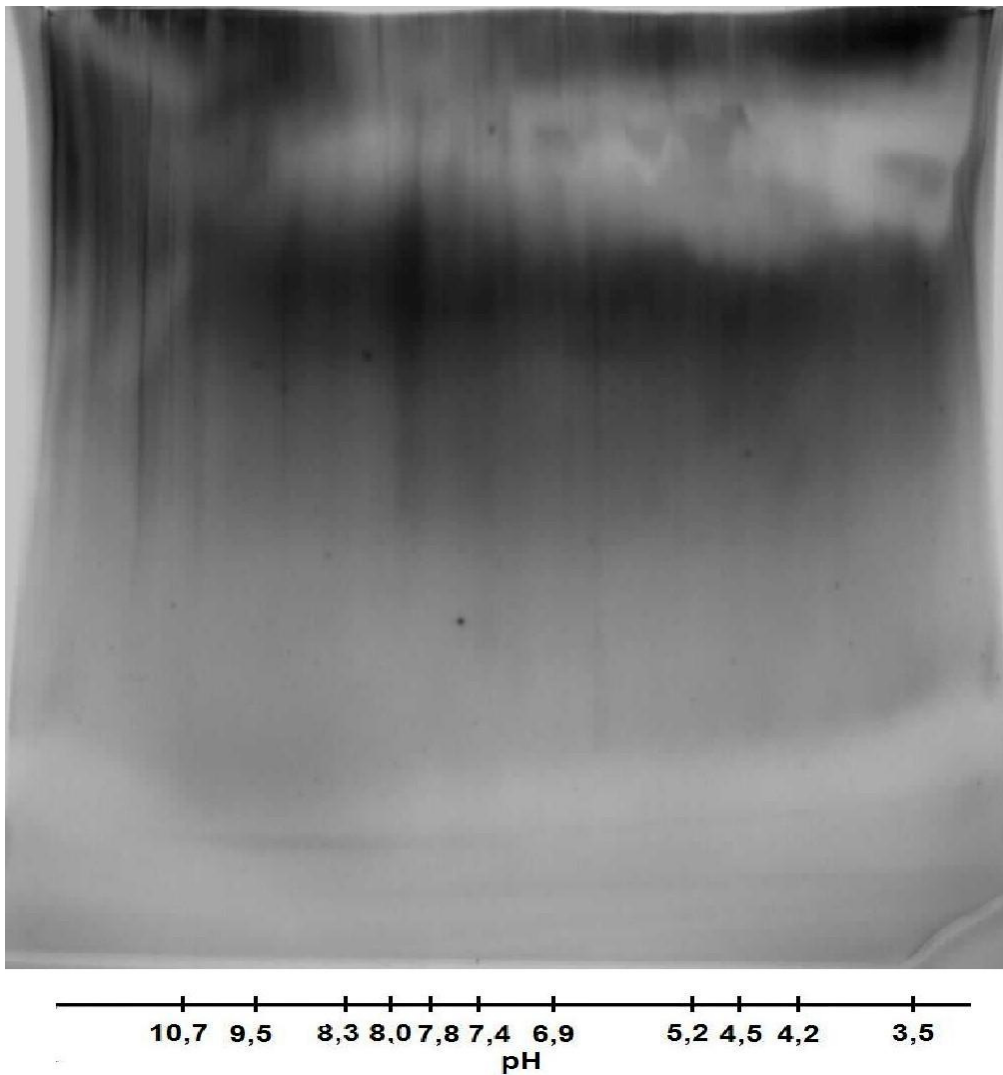


Abbildung 55: Peptidkarte von TLN gespaltenem kommerziellen Kollagentyp I-Standard: Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension mit einem IPG-Streifen von 3-10 und 6600 Vh sowie mit einem 8-16 %igem PAG in der zweiten Dimension (40 µl Auftragsvolumen, Silberfärbung).

Literaturverzeichnis

Asher, S. A.; Mikhonin, A. V.; Bykov, S. (2004) UV raman demonstrates that α -helical polyaniline peptides melt to polyproline II conformations. *Jacs Articles* 126: 8433-8440

Ayad, S.; Boot-Handford, R. P.; Humphries M. J.; Kadler, K. E.; Shuttleworth, C. A.: The extracellular matrix facts book. - 2. Auflage- San Diego: Academic Press, 1998

Bächinger, Hans Peter; Mizuno, Kazunori; Vranka, Janice A.; Boudko, Sergei P. (2010) Collagen Formation and Structure. *Comprehensive Natural Products II* Vol. 5: 469-530

Bailey, A. J.; Paul, R. G.; Knott, L. (1998) Review: Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* 106: 1-56

Bazin, S; Delaunay, A. (1976) Preparation of acid and citrate soluble collagen. The Methodology of connective tissue research. In D. A. Hall (Ed.) *The Methodology of connective tissue research*. Joynton-Bruvvers Ltd., Oxford, England, S. 13-17

Bella, J.; Brodsky, B.; Berman, H. M. (1995) Hydration structure of a collagen peptide. *structure* 3: 893-906

Benya, P. (1981) Two-dimensional CNBr peptide pattern of collagen types I, II and III. *Coll. Res.* 1: 17-26

Bhat, S. V.: *Biomaterials*. - Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002

Bjellqvist, B.; Ek, K.; Righetti, P. G.; Gianazza, E.; Görg, A.; Westermeier, R.; Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 6: 317-339

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99

Borel, J. P.; Randoux, A. (1985) Methodological approach to the primary structure of collagen. *Front Matrix Biology* 10: 1-58

Bornstein, P.; Piez, K. A. (1964) A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular cross-linking. *J. Clinical Investigation* 43: 1813-1823

Bornstein, P.; Piez, K. A. (1965) Collagen: structural studies based on the cleavage of methionyl bonds. *Science* 148: 1353-1355

Bornstein, P. (1974) The biosynthesis of collagen. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 567-603

Bornstein, P. (2002) The NH₂-terminal propeptides of fibrillar collagens: highly conserved domains with poorly understood functions. *Matrix Biology* 21: 217-226

Braunschweig Enzyme Database (BRENDA). URL:<<http://www.brenda-enzymes.org>>, verfügbar am 06.07.2010

Brinckmann, J. (2005) Collagens at a glance. *Top Curr Chem* 247: 1-6

Brodsky, B.; Ramshaw, J. A. M. (1997) The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology* Vol. 15: 545-554

Brown, T. L.; LeMay, H. E.; Bursten, B. E.: *Chemie: Die Zentrale Wissenschaft.* - 10. aktualisierte Auflage- München: Pearson, 2007

Buchholz, K.; Kasche, V.: *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie.* - Weinheim: VCH, 1997

Butler, W. T.; Ponds, S. L. (1971) Chemical studies on the cyanogen bromide peptides of rat skin collagen: amino acid sequence of α 1-CB4. *Biochemistry* 10: S. 2076-2081

Byers, P. H.; McKenney, K. H.; Lichtenstein, J. R.; Martin, G. R. (1974) Preparation of type III procollagen and collagen from rat skin. *Biochemistry* 13: 5243-5248

Chandrakasan, G; Torchia, D. A.; Piez, K. A. (1976) Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251: 6062-6067

Chintala, S. K.; Rao, J. S. (1999) Matrix metalloproteinases: regulation and biological functions. *Proc. Indian Acad. Sci.* 111: 263-273

Chung, E.; Miller, E. J. (1974) Collagen polymorphism: characterization of molecule with the chain composition [α ₁(III)]₃ in human tissues. *Science* 183: 1200-1201

Chung, L.; Dinakarpanian, D.; Yoshida, N.; Lauer-Fields, J. L.; Fields, G. B.; Visse, R.; Nagase, H. (2004) Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *The EMBO Journal* 23: 3020-3030

Clark, I. M.; Cawston, T. E. (1989) Fragments of human fibroblast collagenase: purification and characterization. *Biochem. J.* 263: 201-206

Clark, D. P.; Pazdernik, N. J.: *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen.*– Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009

Cole, W.; Chan, D. (1981) Analysis of the heterogeneity of human collagens by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 197: 377-383

Corbett, J.; Dunn, M. J.; Posch, A.; Görg, A. (1994) Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15: 1205-1211

Cowin, S. C.; Doty, S. B.: *Tissue mechanics.* - New York: Springer, 2007

Endo, S. (1962) Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 40: 346-353

Eyre, D. R.; Wu, J. -J. (2005) Collagen cross-links. *Top Curr Chem* 247: 207-229

Feder, J. ; Garrett, L. R.; Wildi, B. S. (1971) Role of calcium in TLN. *Biochemistry* 10: 4552-4556

Fietzek, P. P.; Kühn, K. (1975) Information contained in the amino acid sequenz of the $\alpha 1(I)$ -chain of collagen and its consequences upon the formation of the triple helix, of fibrils and crosslinks. *Molecular & Cellular Biochemistry Volume 8*: 141-157

Fratzl, P.: *Collagen and mechanics.* - Berlin: Springer Science and Business Media, 2008

Friess, W. (1998) Collagen: biomaterial for drug delivery. *Europ. J. Pharm. Biopharm* 45: 113-136

Fuchs, G.; Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. - 8. Auflage- Stuttgart: Thieme, 2007

Furthmayr, H.; Timpl, R. (1971) Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 41: 510-516

Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55: 1531-1546

Gey, M. H.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. -2. Auflage- Berlin: Springer, 2008

Görg, A.; Postel, W.; Günther, S. (1988) Review: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-546

Görg, A.; Klaus, A.; Lück, C.; Weiland, F.; Weiss, W.: HUPO 2007 Education Program October 6, 2007 Seoul: Today's 2-D Electrophoresis Technology. URL:<http://www.wzw.tum.de/proteomik/2D_Tutorial-Gorg_2007.pdf>, verfügbar am 13.10.2010

Graßmann, W.; Hannig, K.; Engel, J. (1961) Das quantitative Verhältnis zwischen α - und β -Komponente des denaturierten, löslichen Kollagens in der Ultrazentrifuge sowie Beschreibung einer schneller sedimentierenden γ -Komponente. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 324: 284-288

Gross, E.; Witkop, B. (1962) Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biolog. Chem.* 237: 1856-1860

Gross, J.; Nagai, Y. (1965) Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Biochemistry* 54: 1197-1204

Grossauer, A.: Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. - Zürich: WILEY-VCH, 2006

Häder, D. -P.; Häder, M.: Moderne Labortechniken: Geräte und Methoden. – Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1993

Hallbach, J.: Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg. - 2. bearb. Auflage- Stuttgart: Thieme, 2006

Hangauer, D. G.; Monzingo, A. F.; Matthews, B. W. (1984) An interactive computer graphics study of TLN-catalyzed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides. *Biochem.* 23: 5730-5741

Harper, E.; Kang, A. H. (1970) Studies on the specificity of bacterial collagenase. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 41: 482-487

Hasty, K. A.; Pourmotabbed, T.; Goldberg, G. I.; Thompson, J. P.; Spinella, D. G.; Stevens, R. M.; Mainardi, C. L. (1990) Human neutrophil collagenase: a distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biolog. Chem.* 265: 11421-11424

Henkel, W.; Dreisewerd, K. (2007) Cyanogen bromide peptides of fibrillar collagens I, III, and V and their mass spectrometric characterization: detection of linear peptides, peptide glycosylation, and cross-linking peptides involved in formation of homo- and heterotypic fibrils. *J. Prot. Res.* 6: S. 4269-4289

Highberger, J. H.; Corbett, C.; Gross, J. (1979) Isolation and characterization of a peptide containing the site of cleavage of the chick skin collagen α_1 [I] chain by animal collagenases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89: 202-208

Hirsch-Kauffmann, M.; Schweiger, M.: *Biologie für Mediziner.* – 4. überarbeitete Auflage- Stuttgart: Thieme, 2000

Jimenez, S.; Harsch, M.; Rosenbloom, J. (1973) Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52: 106-114

Jimenez, S. A.; Bashey R. I.; Benditt, M.; Yankowski, R. (1977) Identification of collagen alpha1(I) trimer in embryonic chick tendons and calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 1354-1361

Junqueira, L. C. U.; Carneiro, J.; Gratzl, M.: *Histologie.* - 6. Auflage- Heidelberg: Springer Science and Business Media, 2005

Kadler, K. E.; Baldock, C.; Bella, J.; Boot-Handford, R. P. (2007) Collagens at a glance. *J. Cell Science* 120: 1955-1958

Kaltschmidt, E.; Wittmann, H. (1970) Ribosomal proteins VII: two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting ribosomal proteins. Anal. Biochem. 36: 401-412

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. - 8. Auflage- Stuttgart: Thieme, 1972

Karlson, P.; Doenecke, D., Koolman, J.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. - 14. Auflage- Stuttgart: Thieme, 1994

Kendrick, K. G.; Margolis, J. (1970) Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. Anal. Biochem. 33: 204-207

Kessler, A.; Rosen, H.; Levenson, S. M. (1960) Chromatographic fractionation of acetic acid-solubilized rat tail tendon collagen. J. Biol. Chem. 235: 989-994

Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues: a novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26: 231-243

Koide, T.; Nagata, K. (2005) Collagen biosynthesis. Top Curr Chem 247: 85-114

Krane, S. M.; Inada, M. (2008) Matrix metalloproteinases and bone. Bone 43: 7-18

Kühn, K; Fietzek, P. P.; Kühn, J. (1963) Die Einwirkung von proteolytischen Enzymen auf unlösliches Kollagen. Naturwissenschaften 50: 444-445

Kühn, K. (1967) Untersuchungen zur Struktur des Kollagens. Die Naturwissenschaften 54: 101-109

Kunsch, K.; Kunsch, S.: Der Mensch in Zahlen. - 2. Auflage- Heidelberg: Spektrum, 2000

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lapière, C. M.; Nusgens, B.; Pierard, G. E. (1977) Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organisation. Conect. Tissue Res. 5: 21-29

- Laurain, G.; Delvincourt, T.; Szymanowicz, A. G. (1980) Isolation of a macromolecular collagenous fraction and AB₂ collagen from calf skin. FEBS Lett. 120: 44-48
- Löffler, G.; Petrides, P. E.: Biochemie und Pathobiochemie. - 6. Auflage- Berlin: Springer, 1998
- Lwebuga-Mukasa, J. S.; Harper, E.; Taylor, P. (1976) Collagenase enzymes from *Clostridium*: characterization of individual enzymes. Biochemistry 15: 4736-4741
- Mallya, S. K.; Mookhtiar, K. A.; Gao, Y.; Brew, K.; Dioszegi, M.; Birkedal-Hansen, H.; van Wart, H. E. (1990) Characterization of 58-kilodalton human neutrophil collagenase: comparison with human fibroblast collagenase. Biochemistry 29: 10628-10634
- Martin, G. R.; Byers, P. R.; Piez, K. A. (1975) Prokollagen. Adv. Enzymol. 42: 167-191
- Matthews, B. W.; Sigler, P. B.; Henderson R.; Blow, D. M. (1967) Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin. Nature 214: 652-656
- Matthews, B. W.; Jansonius, J. N.; Colman, P. M.; Schoenborn, B. P.; Dupourque, D. (1972) Three-dimensional structure of TLN. Nature 238: 37-41
- Matthews, B. W. (1988) Structural basis of the action of TLN and related zinc peptidases. Acc. Chem. Res. 21: 333-340
- Mayne, R.; Burgeson, R. E.: Biology of extracellular matrix: a series: structure and function of collagen types. - Orlando: Academic Press, Inc., 1987
- Michov, B.: Elektrophorese: Theorie und Praxis. – Berlin: de Gruyter, 1995
- Miller, E. J.; Rhodes, R. K. (1982) Preparation and characterization of the different types of collagen. Meth. Enzym. 82: 33
- Moro, L.; Smith, B. D. (1977) Identification of collagen $\alpha 1(I)$ trimer and normal type I collagen in a polyoma virus-induced mouse tumor. Archives of Biochemistry and Biophysics 182: 33-41

Morrison, J. R.; Fidge, N. H.; Greo, B. (1990) studies on formation, separation, and characterisation of cyanogen bromide fragments of human A1 apolipoprotein. *Analyt. Biochem.* 186: S. 145-152

Murphy, G.; Allan, J. A.; Willenbrock, F.; Cockett, M. I.; O'Connell, J. P.; Docherty, A. J. P. (1992) The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biolog. Chem.* 267: 9612-9618

Naumer, H.; Heller, W.: *Untersuchungsmethoden in der Chemie: Einführung in die moderne Analytik.* - 3. Auflage- Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1997

Niemann, C. (1964) Alpha-chymotrypsin and the nature of enzyme catalysis. *Science* 143: 1287-1296

O'Farrell, P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021

Ohuchi, E.; Imai, K.; Fujii, Y.; Sato, H.; Seiki, M.; Okada, Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J. Biol. Chem.* 272: 2446-2451

Pelmenschikov, V.; Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. (2002) A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by TLN. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 284-298

Pietz, K. A.; Eigner, E. A.; Lewis, M. S. (1963) The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens. *Biochemistry* 2: 58-66

Pühler, A.; Regitz, M.; Schmidt, R. D.: *Römpch Kompakt: Lexikon Biochemie und Molekularbiologie.* - Stuttgart: Thieme, 2000

Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. (1961) Structure of collagen. *Nature* 190: 1004-1005

Rehm, H.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.* - 5. Auflage- München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2006

Reich, G.: Kollagen: Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung. - Dresden: Theodor Steinkopff Verlag, 1966

Rhodes, R. K.; Miller, E. J. (1978) Physiochemical characterization and molecular organization of collagen A and B chains. *Biochemistry* 17: 3442-3448

Ricard-Blum, S.; Ruggiero, F.; van der Rest, M. (2005) The collagen superfamily. *Top Curr Chem* 247: 35-84

Rich, A.; Crick, F. H. C. (1961) The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* 3: 483-506

Righetti, P. G.: Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. - Amsterdam: Elsevier, 1983

Shanmugasundaram, N.; Ravikumar, T; Babu, M. (2004) Comparative physico-chemical and in vitro properties of fibrillated collagen scaffolds from different sources. *J. Biomat. Appl.* 18: 247-264

Shupp-Byrne, D. E.; Church, R. L. (1982) "Embryonic" collagen (type I trimer) alpha 1-chains are genetically distinct from type I collagens alpha 1-chains. *Coll. Relat. Res.* 2: 481-94

Silver, F. H.: Mechanosensing and mechanochemical transduction in extracellular matrix: biological, chemical, engineering and physiological aspects. - Berlin: Springer, 2006

Smith, B. J. (2007) Chemical cleavage of proteins at methionyl-X peptide bonds. In J. M. Walker (2. Ed.) Humana Press Inc., Totowa, S. 485-491

Svensson, H. (1961) Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chem. Scand.* 15: 325-341

Tajima, M.; Urabe, I.; Yutani, K.; Okada, H. (1976) Role of calcium ions in the thermostability TLN and *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* neutral protease. *Eur. J. Biochem.* 64: 243-247

Tanaka, S.; Hata, R. -I.; Nagai, Y. (1981) Two-dimensional electrophoresis patterns of the CNBr peptides of collagen types I, II, III and V. *Coll. Res.* 5: 445-452

Thompson, J. B.; Kindt, J. H.; Drake, B.; Hansma, H. G.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. (2001) Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature* 414: 773-775

van den Berg, F.; Cabri, J.: *Angewandte Physiologie: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen.* - 2. Korrigierte Auflage- Stuttgart: Thieme, 2003

van der Rest, M.; Bennett, H. P. J.; Solomon, S.; Glorieux, F. H. (1980) Separation of collagen cyanogen bromide-derived peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biochem. J.* 191: 253-256

Vogler, C.: *Quantifizierung verschiedener Kollagentypen in Gewebeproben mittels elektrophoretischer und chromatographischer Methoden.* - 2009. - 105 S. Hochschule Mittweida, Fachbereich Mathematik, Physik, Informatik, Diplomarbeit, 2009

Walker, J. M.: *The protein protocols handbook.* – 2. ed. - Totowa: Human Press, 2002

Westermeier, R.: *Elektrophorese-Praktikum.* - Weinheim: VCH, 1990

Wollrab, A.: *Organische Chemie: Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten.* - 3. Auflage- Berlin: Springer, 2009

Yoshida, E.; Noda, H. (1965) Isolation and characterization of collagenases I and II from *Clostridium histolyticum*. *Biochim. Biophys. Acta* 105: 562-574

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt haben.

Freiberg, 27.Oktober 2010

Sascha Adler